UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Prospecção toxicológica e farmacológica *in vitro* e *in vivo* de oleorresinas, extratos das folhas e compostos isolados de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer

MARIVANE LEMOS

RIBEIRÃO PRETO
2016

MARIVANE LEMOS

Prospecção toxicológica e farmacológica *in vitro* e *in vivo* de oleorresinas, extratos das folhas e compostos isolados de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Marivane Lemos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Coorientadora: Profa. Dra. Helen Sheridan

RIBEIRÃO PRETO
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lemos, Marivane

Prospecção toxicológica e farmacológica *in vitro e in vivo* de oleorresinas, extratos das folhas e compostos isolados de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer, Ribeirão Preto, 2016.

338 p..il.; 30 cm.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Coorientadora: Profa. Dra. Helen Sheridan

Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

1.*Copaifera*. 2. Plantas medicinais. 3. Dor e inflamação. 4. Toxicologia. 5. Gastroproteção. 6. Cultura de células.

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Marivane Lemos

Título do trabalho: Prospecção toxicológica e farmacológica *in vitro* e *in vivo* de oleorresinas, extratos das folhas e compostos isolados de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu filho, *Luiz Miguel*.

A você, que tanto senti falta, e que tanto amo.

"Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem,

nem da sorte, nem do dinheiro.

Que ela possa vir com toda a simplicidade, de dentro para

fora, de cada um para todos."

Carlos Drummond de Andrade

Agradeço em especial aos meus pais, *Lurdes* e *Alterino*.

Pelo dom da vida e pelo incentivo.

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, e mais preciso ainda!"

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir viver com força e fé para acreditar nesta experiência, que muitas vezes se mostrou difícil, mas hoje prova-se que não é mais impossível.

Aos meus pais e irmãos, e principalmente ao meu filho, por acreditarem em mim e me apoiarem nesta decisão, entendendo minhas ausências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela oportunidade e pelos inúmeros aprendizados, pela amizade, confiança e palavras que me incentivavam e acalmavam por inúmeras vezes diante dos imprevistos.

À minha coorientadora, Prof. Helen Sheridan, da *School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Faculty of Health Sciences, Trinity College Dublin*, em Dublin (Irlanda), por me receber para estágio-sanduíche de maneira tão hospitaleira e gentil, e por me orientar, que mesmo com a correria do seu dia-a-dia e com a distância, sempre arrumava tempo para me passar um pouco do seu conhecimento, sugestões e correções. Por me permitir conhecer esse país e povo tão maravilhoso, ao qual sinto muitas saudades.

Aos amigos feitos ao longo do percurso, do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP, Rosana, Mariza, Juliana, Cristiane, Tatiane, Erick, Jonas, Federico, Daniela, Tiago, Gari, Marcela, Mohamed, Ricardo, Marcelo, Jenifer, Carol pela convivência gostosa, brincadeiras, risadas e trabalho, muito trabalho. Aos técnicos, em especial ao Mário, que sempre deu um jeitinho para arrumar tudo que a gente precisava para trabalhar. E, com carinho ao Bruno, amigo e colega, e hoje namorado, por sempre me apoiar e auxiliar nos experimentos fitoquímicos, análises cromatográficas, RMN, espectrometria de massas, enfim, com as técnicas analíticas utilizadas neste estudo.

À técnica Izabel Cristina, do Departamento de Física e Química e do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), pelas análises de CG-MS.

Ao técnico Luiz e ao Prof. Fernando, do Departamento de Ciências Farmacêuticas e do AsterBioChem pelas análises no UHPLC-(ESI)-HRMS.

Às amigas do Laboratório de Controle de Qualidade da FCFRP, Soninha, Dayane e Michele, pelo auxílio nos experimentos em culturas de células e para determinação das atividades antioxidantes.

Aos amigos feitos no Laboratório de Farmacologia da FMRP, Fábio, Carlos e David, que mesmo na loucura e corre-corre dos seus experimentos, me auxiliaram tanto na determinação da atividade sobre NF-κB.

Ao Vilmar, hoje já Dr. Vilmar, a Kit e a Paloma, do Trinity Biomedical Sciences, pelo auxílio nos experimentos conduzidos no Trinity College Dublin e conhecimentos transferidos. Aos técnicos John e Peter pela atenção no fornecimento dos reagentes e análises cromatográficas. À Lilian e a Letícia, da UFRJ, que ajudaram muito a me adaptar a vida em Dublin e pelo companheirismo nas horas difíceis. E ao Prof. Neil, que junto com a Profa. Helen foram muito atenciosos ao me receber.

Ao Prof. Sérgio Faloni de Andrade, Profa. Luiza Motta e à Profa. Márcia Maria de Souza, que me receberam novamente no Laboratório de Farmacologia da UNIVALI e me axiliaram nos experimentos de *Open Field*, *Rota Rod* e efeito sobre a enzima H^+, K^+-ATPase. A minha amiga Francielle Zanatta, ao meu tio Camilo e sua esposa Simone, meus pontos de apoio em Santa Catarina, os quais sempre me deram abrigo nas viagens para execução dos experimentos acima descritos.

Aos funcionários do SAC da FCFRP, Carmem da recepção, Dra. Claudia e Dra. Ana Paula, do setor de hematologia, e Dra. Luiza e Dra. Luciana do setor de bioquímica pelas análises realizadas nos estudos de toxicologia.

À Profa. Simone e Profa. Renata, ambas da FCFRP pela disponibilização do microscópio para obtenção das imagens histológicas.

As professoras da disciplina de Farmacologia da FCFRP, Profa. Glória, Profa. Sâmia, Profa. Sandra, e em especial a Profa. Ana Maria pelos ensinamentos transmitidos durante o estágio PAE nesta disciplina.

Aos funcionários da oficina de precisão do campus de Ribeirão Preto pela eficiente e cuidadosa fabricação de equipamentos para os experimentos de gastroproteção e hiperalgesia.

Aos funcionários do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto e do Biotério de Apoio das Faculdades de Farmácia e Odontologia do Campus de Ribeirão Preto, pela cordialidade no atendimento durante o fornecimento dos animais. Meu muito obrigado, vocês facilitaram o meu trabalho por incontáveis vezes.

E em especial, agradeço à Joselita Rosa dos Santos, a *Jô*, minha amiga, meu apoio e que sempre me acolheu como mãe aqui em Ribeirão Preto. Muito obrigada pelo carinho e amizade.

E por fim, agradeço a ampla disponibilidade de infraestrutura, bem como a significativa credibilidade em meu trabalho por meio de excelentes suportes financeiros tais como bolsas e projetos regulares:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Trinity College Dublin
Coláiste na Tríonóide, Baile Átha Cliath
The University of Dublin
TCD award n. 203327.13221

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Bolsa de Doutorado Processo n. 2012/09727-8
Projeto temático "Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*" Processo n. 2011/13630-7

Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
PDSE/CAPES Project BEX 7277/14-8.

"Quem come do fruto do conhecimento é sempre expulso de algum paraíso".

Melanie Klein

RESUMO

LEMOS, M. Prospecção toxicológica e farmacológica *in vitro* e *in vivo* de oleorresinas, extratos das folhas e compostos isolados de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer. 2016. 338 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Plantas medicinais são uma fonte rica na obtenção de moléculas com potencial terapêutico. No Brasil cerca de 40% da população utiliza plantas medicinais como alternativa terapêutica. Porém, grande parte das plantas nativas brasileiras não apresentam estudos científicos que comprovem a eficácia e a segurança. Além disso, devido à enorme biodiversidade, o número de espécies estudas ainda é pequeno, e representa um vasto campo a ser explorado. Neste contexto, as oleorresinas de planta do gênero *Copaifera* apresentam poucos estudos sob o ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico. Suas partes aéreas, tais como folhas os estudos ainda são escassos. Dentro deste contexto, este projeto buscou avaliar a toxicologia de oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer, e compreender preliminarmente os mecanismos envolvidos nos processos de citoproteção e cicatrização de úlceras gástricas, bem como os processos anti-inflamatórios e antinociceptivos, atribuídos popularmente e previamente descritos na literatura para a oleorresina das copaíbas. Além disso, existem poucos estudos para *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer. Com base nos padrões de fragmentação obtidos nas análises em CG-MS e em UHPLC-(ESI)-HRMS permitiu concluir que as oleorresinas apresentam compostos da classe de sesquiterpenos e diterpenos, assim como descrito na literatura. Nos extratos das folhas foi possível observar a presença de flavonoides e derivados galoilquínicos, já descritos para as folhas da espécie, e epicatequinas, descrito na família Fabacea, mas não isolado ainda em espécies de *Copaifera* spp. Os resultados dos ensaios a atividade citotóxica em linhagens não neoplásicas (CHO-k1 e L929) e neoplásicas (AGS e THP-1) por meio do ensaio de viabilidade celular por fosfatase ácida, e no ensaio de morte celular determinada por iodeto de propídio em citometria de fluxo para as células AGS e THP-1 demonstram que as oleorresinas, extratos e substâncias isoladas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* apresentam atividade citotóxica preferencial em células neoplásicas, confirmando a atividade antitumoral já descrita na literatura. Na avaliação da toxicidade aguda por dose fixa, o extrato das folhas de *C. oblongifolia*, *C. duckei* e o ácido polialtico são seguros até a dose de 2000 mg/kg. A administração da oleorresina promove alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas, principalmente ligadas ao metabolismo hepático, renal e pancreático. A oleorresina de *C. duckei* é tóxica na dose de 2000 mg/kg, promovendo a morte dos animais após 48 h da sua administração. No experimento com doses repetidas em 90 dias não houve morte dos animais tratados com 1, 10 e 100 mg/kg de oleorresina de *C. duckei,* porém houveram alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas, embora menos evidente, no metabolismo hepático, renal e pancreático. Quanto a gastroproteção, as oleorresinas e os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* promovem efeitos citoproterores sobre a mucosa gástrica nos modelos de EtOH/HCl e AINEs. As frações em diclorometano e acetato de etila do extrato das folhas de ambas as espécies de *Copaifera* spp. contêm os compostos que podem ser responsáveis pela citoproteção gástrica. Sesquiterpenos, diterpenos, flavonoides e derivados galoilquínicos também foram avaliados, demonstrando atividades gastroprotetoras no modelo de úlceras induzidas por EtOH/HCl. Tanto a oleorresina quanto o extrato das folhas de *C.*

oblongifolia e *C. duckei* apresentam atividade cicatrizante gástrica no modelo de úlceras induzidas por ácido acético, e aumentam a proliferação celular no ensaio de *wound scratch* em L929. A oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei* não contribui para o aumento do pH estomacal, mas diminuiu a quantidade de íons H^+ secretada. Os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* aumentaram significativamente a quantidade de muco, favorecendo as defesas gástricas. A oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* são ativas contra a bactéria *H. pylori*, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Os extratos de *C. oblongifolia* e *C. duckei* possuem maior atividade antioxidante – *in vitro* e *in vivo* – quando comparados à oleorresina. Em parte, os metabólitos presentes nas oleorresinas e nos extratos das folhas de C*. oblongifolia* e *C. duckei* promovem efeitos citoprotetores e cicatrizantes, interferindo na secreção de ácido, conforme demonstrado no ensaio sobre a enzima H^+, K^+-ATPase, aumentando a secreção de muco e favorecendo os mecanismos de defesa antioxidantes. Procurando verificar se a atividade antinociceptiva estava relacionada a ação no SNC dos animais, avaliaram-se as oleorresinas e os extratos das folhas das espécies de *Copaifera* spp. na função e coordenação motora dos animais, através dos testes de *Open field* e *Rota rod.* Nenhum tratamento interferiu na função e na coordenação motora dos animais. A oleorresina de *C. duckei* e sua substância majoritária, o ácido poliáltico foram testados quanto a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, tanto sob o ponto de vista agudo, quanto crônico. Foram utilizados os métodos de contorções abdominais por ácido acético, nocicepção aguda por formalina, nocicepção térmica por *tail-flick*, hiperalgesia mecânica, edema de pata e *air pouch* (avaliação do exsudato na bolsa de ar) induzida por diversos agentes, tais como formalina, carragenina, dextrana, LPS e zymosan. Além disso, foram investigadas de forma preliminar as atividades contra dor crônica induzida por avulsão do plexo braquial (APB) e hipernocicepção induzida por CFA durante 15 dias. Em todos os ensaios houve redução tanto da resposta nociceptiva quanto da atividade inflamatória, sugerindo que há ação antinociceptiva a nível periférico, ou por inibição do sinal nociceptivo ou pela diminuição de mediadores que estimulam os nociceptores, que diminuir a migração celular e a concentração de mieloperoxidase (MPO) no local da lesão. Em células THP-1 estimuladas por LPS, os tratamentos com as oleorresinas, extratos e substâncias majoritárias de *C. oblongifolia* e *C. duckei* diminuíram os níveis de citocinas pró-inflamatórias INF-γ, IL-1β, IL-6 e TNF-α. Os níveis de IL-10 foram parcialmente reduzidos com estes tratamentos. A ação sobre citocinas pró-inflamatórias sugere atividade anti-inflamatória tanto aguda quanto crônica, tendo em vista que o experimento possui os tempos de 24 h e 72 h e esta diminuição é dose dependente. Além disso, a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico interferem nos níveis de NF-κB determinados no ensaio da luciferase. Estes resultados indicam que pode estar havendo interação com os receptores TLR4 e TLR2, que interferem na via do NF-κB e diminuem os eventos inflamatórios e apoptóticos oriundos desta via, confirmando as atividades estudadas. As atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias observadas no tratamento com a oleorresina de *Copaifera* spp. ou suas substâncias isoladas podem ser devido a diminuição da liberação ou síntese de mediadores relacionados à resposta inflamatória, que resulta em diminuição do estímulo nociceptivo. As atividades citotóxicas descritas indicam que existe potencial efeito antitumoral que justifica o estudo para o desenvolvimento de substâncias com atividade antitumoral, em especial atenção para os cânceres gástricos e ligados ao sistema imunológico, tendo em vista a seletividade citotóxica em linhagens tumorais AGS e THP-1. Os resultados apresentados neste trabalho são inéditos, tendo em vista que é escasso na literatura dados sobre a *C. oblongifolia*, e dados sobre o uso a longo

prazo de oleorresinas e extratos de *Copaifera.* Além disso, os achados fitoquímicos sugerem que existe potencial investigação química, pois muitas substâncias ainda não foram isoladas das espécies. Ainda, estes resultados contribuem para a confirmação das atividades farmacológicas atribuídas popularmente para as espécies de *Copaifera* spp., sendo que pela primeira vez observou-se que a oleorresina é efetiva para o tratamento de doenças inflamatórias e dolorosas crônicas, tornado a planta alvo para o estudo mais aprofundado dos mecanismos de ação farmacológicos envolvidos, fornecendo subsídios para estudos posteriores que poderão servir ao desenvolvimento de um novo fitoterápico no Brasil.

Descritores: 1.*Copaifera.* 2. Plantas medicinais. 3. Dor e inflamação. 4. Toxicologia. 5. Gastroproteção. 6. Cultura de células.

ABSTRACT

LEMOS, M. Toxicological and pharmacological prospection *in vitro* and *in vivo* oil resins, leaf extracts and isolated compounds from *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer. 2016. 338 p. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Medicinal plants are a rich source of potentially bioactive molecules. In Brazil, about 40% of the population use medicinal plants as an alternative therapy. However, most Brazilian native plants have no scientific studies proving their effectiveness and safety. Additionally, due to the enormous Brazilian biodiversity, the number of studied species is still small, and it represents a vast field to be explored. In this context, oleoresins from plants belonging to the genus *Copaifera* have few studies regarding its chemical, pharmacological and toxicological properties. For its aerial parts such as leaves, the studies are also scarce. Within this context, this project sought to assess the toxicology of oleoresins and leaf extracts of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer, and understand preliminarily the mechanisms involved in wound healing processes and cytoprotection of gastric ulcers, as well as the anti-inflammatory and antinociceptive processes, commonly assigned and previously described in the literature for the copaiba oleoresin. Furthermore, there are few studies of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer. Based on the fragmentation patterns obtained in the GC-MS and UHPLC-(ESI)-HRMS analyses it was concluded that oleoresins possess compounds of the sesquiterpene and diterpene class, as described in the literature. In leaf extracts, it was observed the presence of flavonoids and galoilquinic acid derivatives, as previously described for the leaves of this species, and epicatechins, described in the Fabaceae family, but not reported thus far in species of *Copaifera* spp. The results of the cytotoxic tests on neoplastic (AGS and THP-1) and non-neoplastic lines (CHO-k1 and L929) by cell viability assay for acid phosphatase, and cell death assay determined by propidium iodide in flow cytometry for AGS and THP-1 cells demonstrate that oleoresins, extracts and compounds isolated from *C. oblongifolia* and *C. duckei* present preferred cytotoxic activity on neoplastic cells, thus confirming the antitumor activity already described in literature. In the evaluation of acute toxicity by a fixed dose, leaf extracts from *C. oblongifolia*, and *C. duckei* and polyalthic acid are safe at doses up to 2000 mg / kg. The administration of oleoresin promotes hematological, biochemical and histological changes, mainly linked to liver, kidney and pancreatic metabolism. *C. duckei* oleoresin is toxic at a dose of 2000 mg / kg, promoting death of animals after 48 hours of its administration. In the experiment with repeated doses in 90 days there was no death of animals treated with 1, 10 and 100 mg / kg of *C. duckei* oleoresin, but there were hematological, biochemical and histological changes, although less obvious, in hepatic, renal and pancreatic metabolism. Regarding gastroprotection, the oleoresins and extracts from *C. oblongifolia* and *C. duckei* leaves promote cytoprotective effects on gastric mucus in EtOH/HCl and NSAIDs models. The dichloromethane and ethyl acetate fractions from crude leaves extract of both species *Copaifera* spp. contain compounds which may be responsible for gastric cytoprotection. Sesquiterpenes, diterpenes, flavonoids and galoilquinic acid derivatives were also evaluated, demonstrating gastroprotective activities in the model of ulcers induced by EtOH/HCl. Oleoresin and leaf extracts from *C. oblongifolia* and *C. duckei* present gastric healing activity in the model of ulcers induced by acetic acid, and increase cell proliferation in the L929 wound scratch assay. *C. oblongifolia* and *C. duckei* oleoresin do not increase the stomach pH, but decrease

the amount of H + ions secreted. *C. oblongifolia* and *C. duckei* leaf extracts significantly increased the quantity of mucus, favoring gastric defense. Oleoresin and leaf extract of *C. oblongifolia* are active against the bacteria *H. pylori*, both *in vitro* and *in vivo*. *C. oblongifolia* and *C. duckei* leaf extracts have higher antioxidant activity - *in vitro* and *in vivo* - compared to their oleoresins. In part, the metabolites present in oleoresins and in leaf extracts of *C. oblongifolia* and *C. duckei* promote healing and cytoprotective effects, interfering in the secretion of acid, as demonstrated in enzyme test against H +, K + -ATPase, increasing the secretion of mucus and favoring the antioxidant defense mechanisms. In order to verify whether the antinociceptive activity was related to ab effect in the CNS of animals, we evaluated oleoresins and leaf extracts in the function and motor coordination of animals, through the Open field and Rota rod test. No treatment interfered in the function and motor coordination of animals. *C. duckei* oleoresin and its major substance, polyalthic acid were tested for anti-inflammatory and antinociceptive activity, both in the acute and chronic models. Different methods were used such as writhing by acetic acid, acute nociception formalin, thermal nociception by tail-flick, mechanical hyperalgesy, paw edema and air pouch (exudate assay in air pouch) induced by various agents, such as formalin, carrageenan, dextran, zymosan and LPS. Additionally, there were preliminarily investigated activities against chronic pain induced by brachial plexus avulsion (APB) and hyperalgesy induced by CFA for 15 days. In all experiments there was a reduction of in nociceptive response and inflammatory activity, suggesting that there is antinociceptive activity in the peripheral level, by inhibition of the nociceptive signal or by a decrease of mediators that stimulate nociceptors, which decrease cell migration and concentration of myeloperoxidase (MPO) at the site of injury. In THP-1 cells stimulated by LPS, treatments with oleoresins, extracts and Major compounds from *C. oblongifolia* and *C. duckei* decreased levels of proinflammatory cytokines INF-γ, IL-1β, IL-6 and TNF-α. IL-10 levels were partially reduced with these treatments. The action of proinflammatory cytokines suggests both acute and chronic anti-inflammatory activity, considering that the experiment has the times of 24 h and 72 h and this decrease is dose-dependent. Furthermore, *C. duckei* oleoresin and polyalthic acid and interfere with NF-κB levels determined in the luciferase assay. These results indicate that there may be an interaction with the TLR4 and TLR2 receptors that affect the NF-κB pathway and decrease the inflammatory and apoptotic events from this pathway, confirming the studied activities. The antinociceptive and anti-inflammatory activity observed in the treatment with *Copaifera* spp oleoresin. or its isolated substances may be due to a decrease in the release or synthesis of mediators related to the inflammatory response, which results in a decreased nociceptive stimulus. The described cytotoxic activities indicate that there is potential antitumor effect that justifies the study for the development of substances having antitumor activity, especially regarding to gastric cancers and those related to the immune system, considering the cytotoxic selectivity in AGS and THP-1 tumor cell lines. The results presented herein are new, considering the scarce studies regarding *C. oblongifolia*, and long-term use of oleoresins and extracts from *Copaifera*. Moreover, phytochemicals findings suggest that there is potential in the chemical research, as many substances have not yet been isolated from these species. Furthermore, these results contribute to the confirmation of the pharmacological activities assigned commonly to the species of *Copaifera* spp., and this is the first time that oleoresins are found to be effective for the treatment of chronic inflammatory and painful disorders. Thus, this study makes the studied plants an alternative target for further studies concerning the pharmacologic mechanisms of

action involved, providing support for further studies that will serve for the development of a new phytotherapy medicine in Brazil.

Key words: 1.*Copaifera*. 2. Medicinal plants. 3. Pain and inflammation. 4. Toxicology. 5. Gastroprotection. 6. Cell culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Aspecto geral de uma copaibeira (*Copaifera* spp.). **(B)** Detalhe da oleorresina e das folhas de *Copaifera* spp. 49

Figura 2. Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos hidroalcoólico das folhas das espécies de *Copaifera* spp. 58

Figura 3. Representação esquemática do experimento de *Scratch wound* para o estudo do comportamento da migração celular. 70

Figura 4. Ilustração da utilização de monofilamentos de von Frey no teste de estimulação mecânica na pata de camundongos. 89

Figura 5. Etapas dos procedimentos cirúrgicos realizados na APB. (**A**) Região da incisão, (**B** e **C**) anatomia do plexo braquial, (**D**) separação de nervos e vasos, (**E**) preensão do tronco inferior, (**F**) avulsão do tronco inferior. Tronco inferior do plexo braquial (setas pretas); vasos subclávios (setas brancas). 91

Figura 6. Aspecto físico das oleorresinas de Copaifera. Em **A**, oleorresina de *C. oblongifolia* e em **B**, oleorresina de *C. duckei*. 100

Figura 7. Representação esquemática da reação catalisada por fosfatase para formação do *p*-nitrofenolato 113

Figura 8. Gráfico do efeito sobre a proliferação de fibroblastos L929 incubados com as oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL, durante os tempos de 3, 6, 12, 24 e 48h após o *scratch* em relação ao tempo zero 142

Figura 9. Gráfico do efeito sobre a proliferação de fibroblastos L929 incubados com os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL, durante os tempos de 3, 6, 12, 24 e 48h após o *scratch* em relação ao tempo zero 143

Figura 10. Imagens da monocamada de fibroblastos L929 no ensaio de *Scratch.* Imagens obtidas em objetiva de 10, e aumento total de 100x. **(A)** Representa o cultivo de fibroblastos no tempo de 0. **(B)** Representa o cultivo no tempo de 24h. **(C)** Representa o cultivo no tempo de 48h 144

Figura 11. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* **(A** e **C)** e *C. duckei* **(B** e **D)**, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 146

Figura 12. Gráfico do efeito da administração das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa obtidas do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* **(A)** e *C. duckei* **(B)**, na dose de 100 mg/kg, v.o. e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 148

Figura 13. Estruturas químicas testadas no ensaio de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl. 148

Figura 14. Gráfico do efeito da administração do ácido *ent*-agático, ácido caurenoico, ácido polialtico, afzelina, α-humuleno, β-cariofileno, óxido de cariofileno e quercetrina, na dose de

30 mg/kg, v.o., e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 149

Figura 15. Estruturas químicas testadas no ensaio de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl. 150

Figura 16. Gráfico do efeito da administração dos ácidos galoilquínicos presentes no extrato das folhas de espécies de *Copaifera* spp., na dose de 30 mg/kg, v.o., do ácido gálico, na dose de 30 mg/kg, v.o., do ácido quínico, na dose de 30 mg/kg, v.o., e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,3N) em camundongos. 153

Figura 17. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. e ranitidina, na dose de 100 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por AINE (indometacina, 100 mg/kg) em camundongos. 155

Figura 18. Gráfico do efeito da administração oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o. e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N), associado a inibição da NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.) em camundongos. 169

Figura 19. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração da enzima superóxido dismutase de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 171

Figura 20. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração de glutationa de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 171

Figura 21. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração de catalase de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 172

Figura 22. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração de nitrito de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 173

Figura 23. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração da enzima mieloperoxidase de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos 175

Figura 24. Gráfico do efeito do tratamento com a oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na concentração de 10, 100 e 1000 µg/mL, do omeprazol, 34,5 µg/mL e da oubaína, 72,8 µg/mL sobre a sobre a atividade da enzima H^+K^+ ATPase. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s 177

Figura 25. Gráfico do efeito do tratamento com os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na concentração de 10, 100 e 1000 µg/mL, do omeprazol, 34,5 µg/mL e da oubaína, 72,8 µg/mL sobre a sobre a atividade da enzima H^+, K^+- ATPase 178

Figura 26. Gráfico do efeito da administração das oleorresinas e dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, e do ácido poliáltico, na dose de 10 mg/kg, v. o., e do diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., sobre a atividade locomotora em camundongos. **(A)** Exploração horizontal – *crossings*. **(B)** Exploração vertical – *rearings*..... 181

Figura 27. Gráfico do efeito da administração das oleorresinas e dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, e do ácido poliáltico, na dose de 10 mg/kg, v. o., e do diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., sobre a coordenação locomotora em camundongos. 182

Figura 28. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 mg/kg, *v.o.* e indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o., sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de animal, i. p.) em camundongos 184

Figura 29. Estruturas químicas isoladas e identificadas como componentes majoritários da oleorresina de *C. duckei.* 185

Figura 30. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina, na dose de 10 mg/kg, *v.o.*, sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de animal, *i. p.*) em camundongos 185

Figura 31. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o., e morfina, na dose de 1 mg/kg, i.p. sobre o tempo de lambida (s) induzidas por formalina 2,5%/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. (**A**) Primeira fase (0-5', neurogênica). (**B**) Segunda fase (15-30', inflamatória) 189

Figura 32. Gráfico do efeito da administração de ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o., e morfina, na dose de 1 mg/kg, i.p. sobre o tempo de lambida (s) induzidas por formalina 2,5%/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. (**A**) Primeira fase (0-5'). (**B**) Segunda fase (15-30' 192

Figura 33. (**A**) Gráfico do efeito da administração de oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo morfina ($^{\$\$}$p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. (**B**) Gráfico do efeito da administração de naloxona + oleorresina de *C. duckei*, na dose de 1+10 mg/kg, i.p. e v.o. e naloxona + morfina, na dose de 1+ 5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos 194

Figura 34. (**A**) Gráfico do efeito da administração de ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos. Cada linha representa a média

com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo morfina ($^{\$\$}$p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. (**B**) Gráfico do efeito da administração de naloxona + ácido poliáltico, na dose de 1+10 mg/kg, i.p. e v.o. e naloxona + morfina, na dose de 1+5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos..... 196

Figura 35. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de formalina 2,5% (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 198

Figura 36. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de formalina 2,5% (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 199

Figura 37. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, *v.o.*, indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 202

Figura 38. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, *v.o.*, indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 203

Figura 39. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 205

Figura 40. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 206

Figura 41. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 209

Figura 42. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 210

Figura 43. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. 212

Figura 44. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 213

Figura 45. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira ipsilateral 216

Figura 46. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira contralateral 217

Figura 47. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira ipsilateral 218

Figura 48. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira contralateral 219

Figura 49. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 222

Figura 50. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 223

Figura 51. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 225

Figura 52. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 226

Figura 53. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 227

Figura 54. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 228

Figura 55. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. 230

Figura 56. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos..... 231

Figura 57. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 235

Figura 58. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre obre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 235

Figura 59. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 236

Figura 60. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 236

Figura 61. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de C. duckei, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg(1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 238

Figura 62. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre obre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos 238

Figura 63. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos... 239

Figura 64. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 239

Figura 65. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de C. duckei, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de

zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 241

Figura 66. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre obre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (*air pouch*) em camundongos 241

Figura 67. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos... 242

Figura 68. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos 242

Figura 69. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia inflamatória no teste de von Frey induzida pela injeção de CFA 20µL/pata (1 mg/mL, i. pl.) em camundongos 246

Figura 70. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia inflamatória no teste de von Frey induzida pela injeção de CFA 20µL/pata (1 mg/mL, i. pl.) em camundongos 247

Figura 71. Representação esquemática da placa no sistema *multi-spot* 253

Figura 72. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de INF- γ (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de INF-γ (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot* 255

Figura 73. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-1β (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-1β (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot* 257

Figura 74. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-6 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-6 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot* 259

Figura 75. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-10 (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-10 (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot* 261

Figura 76. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de TNF-α (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de TNF-α (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*..... 263

Figura 77. Gráfico do efeito do tratamento com a oleorresina de *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL e do ácido poliáltico nas concentrações de 10 e 30 µM no teste atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc induzido por LPS 1 µg/mL (ensaio da luciferase. Os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). 267

Figura 78. Gráfico do efeito do tratamento com a oleorresina de *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL e do ácido poliáltico nas concentrações de 10 e 30 µM no teste atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc induzido por PGN 1 µg/mL (ensaio da luciferase. Os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).. 268

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido. 60

Tabela 2. Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido. 61

Tabela 3. Rendimentos das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia.* 101

Tabela 4. Rendimentos das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. duckei* 101

Tabela 5. Composição química da oleorresina de *C. oblongifolia* no método A..... 102

Tabela 6. Composição química da oleorresina de *C. duckei* no método A..... 103

Tabela 7. Composição química da oleorresina de *C. duckei* no método B..... 103

Tabela 8. Composição química das oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na coluna Ascentis Express® C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) hidróxido de amônio-metanol-acetonitrila 0,1:89,9:10, com eluição em modo gradiente de acordo com a **Tabela 1**. Vazão: 0,5 mL/min..... 106

Tabela 9. Composição química dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na coluna Synergi® Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) iso-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6, com eluição em modo gradiente de acordo com a **Tabela 2**. Vazão: 0,68 mL/min..... 108

Tabela 10. Valores de concentração citototóxica 20% (CC20), 50% (CC50) e 80% (CC80) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido polialtico e os controles citotóxicos paclitaxel, camptotecina, celecoxib e indometacina no teste de viabilidade celular em linhagem celular CHO-k1 por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas)..... 115

Tabela 11. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, ácido poliáltico e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular L929 por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas)..... 116

Tabela 12. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre o peso corporal, consumo de água e ração dos animais durante o teste de toxicidade aguda..... 120

Tabela 13. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre o peso corporal, consumo de água e ração dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica 120

Tabela 14. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre o hemograma (série vermelha) dos animais durante o teste de toxicidade aguda 122

Tabela 15. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre o hemograma (série vermelha) dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica..... 123

Tabela 16. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre o hemograma (série branca) dos animais durante o teste de toxicidade aguda 125

Tabela 17. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre o hemograma (série branca) dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica..... 126

Tabela 18. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos dos animais durante o teste de toxicidade aguda 128

Tabela 19. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica..... 129

Tabela 20. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre a proporção dos órgãos dos animais durante o teste de toxicidade aguda 132

Tabela 21. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre a proporção dos órgãos dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica 133

Tabela 22. Detalhes de cortes histológicos do fígado, pâncreas e rins após a administração oral da oleorresina de *C. oblongifolia* (2000 mg/kg) e *C. duckei* (1000 mg/kg)..... 134

Tabela 23. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular AGS por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). 135

Tabela 24. Valores de porcentagem de células vivas e mortas para o branco (sem adição de PI), controle, DMSO 2%, a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de determinação de morte celular por iodeto de propídio por citometria de fluxo em linhagem celular AGS (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). 136

Tabela 25. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para o ácido gálico, ácido quínico, os 16 ácidos galoílquinicos derivados de *Copaifera* spp. , e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular AGS por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas)..... 138

Tabela 26. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos..... 146

Tabela 27. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e das frações de *C. oblongifolia* e de *C. duckei* (100 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos. 147

Tabela 28. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e de substâncias isoladas a partir da oleorresina e extrato de folhas de *Copaifera* spp. (30 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos. 149

Tabela 29. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e pantoprazol (30 mg/kg), do ácido gálico, do ácido quínico e de 16 ácidos galoilquínicos (30 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos**.** 152

Tabela 30. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por AINEs (indometacina, 100mg/kg) em camundongos. 154

Tabela 31. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) em camundongos. 157

Tabela 32. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) em camundongos. 157

Tabela 33. Detalhes de cortes histológicos de estômagos após a administração oral da oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg), durante 7 dias em animais submetidos ao teste de úlceras crônicas por ácido acético**.** 158

Tabela 34. Efeitos da administração intraduodenal de indometacina (100 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica ácida e na secreção de muco de camundongos submetidos à ligadura de piloro. 160

Tabela 35. Resultados da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* sobre a bactéria *Helicobacter pylori* 162

Tabela 36. Resultados da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* sobre a bactéria *Helicobacter pylori* 162

Tabela 37. Efeitos da administração oral de claritromicina (25mg/kg) + amoxicilina (50 mg/kg) + omeprazol (20 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) com co-infecção por *Helicobacter pylori* em camundongos. 163

Tabela 38. Efeitos da administração oral de claritromicina (25mg/kg) + amoxicilina (50 mg/kg) + omeprazol (20 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) com co-infecção por *Helicobacter pylori* em camundongos. 164

Tabela 39. Resultados da concentração efetiva máxima (EC_{50}) e dos coeficientes de correlação linear (R^2) obtidos pelo ácido gálico, pela oleorresina e pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na avaliação da atividade doadora de H• ao radical DPPH• 165

Tabela 40. Contagem de fótons por minuto,% inibição da emissão luminescente, concentração efetiva máxima (CE_{50}) e dos coeficientes de correlação linear (R^2) dos extratos hidroalcóolico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na avaliação da atividade antioxidante sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/xantina oxidase/luminol. 166

Tabela 41. Resultados da % inibição da peroxidação lipídica obtidos pelo pela oleorresina e pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica sobre gema de ovo..... 167

Tabela 42. Efeito da administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas por etanol/HCl associado a inibição da NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.). 169

Tabela 43. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular THP-1 por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). 249

Tabela 44. Valores de porcentagem de células vivas e mortas para o branco (sem adição de PI), controle, DMSO 2%, a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de determinação de morte celular por iodeto de propídio por citometria de fluxo em linhagem celular THP-1 (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). 250

Tabela 45. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico, no teste de viabilidade celular em linhagem celular RAW-264.7-Luc por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). 265

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Fórmula para cálculo da porcentagem da viabilidade celular. Legenda: $xABStratado$= média da absorvância do grupo tratado; $xABSbranco$: média da absorvância do branco; $xABScontrole\ negativo$:média da absorvância do controle negativo. 66

Equação 2. Fórmula para determinação do índice de cura. Legenda: $\%ALtratado$: Porcentagem de área lesada do grupo tratado; $x\%ALcontrole$: Média da porcentagem de área lesada do grupo controle 71

Equação 3. Fórmula para determinação do índice de cura. Legenda: $\%\mathrm{ALtratado}$: Porcentagem de área lesada do grupo tratado; $x\%ALcontrole$: Média da porcentagem de área lesada do grupo controle 73

Equação 4. Fórmula para determinação da porcentagem de inibição da atividade antioxidante. Legenda: $Aamostra$: Absorvância da amostra, nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) da amostra nos métodos quimioluminescentes;$Acontrole\ positivo$: Absorvância do controle positivo nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) do controle positivo nos métodos quimioluminescentes 78

Equação 5. Fórmula para cálculo da porcentagem da inibição da peroxidação lipídica. Legenda: $A0$= absorvância do branco (controle); $A1$: absorvância da amostra. 81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$[M+H]^+$	*positive ion mode*; modo positivo
$[M-H]^-$	*negative ion mode*; modo negativo
5-HT	serotonina
$5\text{-}HT_3$	receptor de serotonina do tipo 3
5-LOX	enzima 5-lipoxigenase
ABP	avulsão do plexo braquial
ABS	absorvância
ACTH	adrenocorticotropic hormone; hormônio adrenocorticotrófico
AGS	linhagem celular derivada de *Homo sapiens*, adenocarcinoma gástrico – ATCC® CRL-1739®
AINEs	anti-inflamatório não esteroidal
ALT	alanina aminotransferase
AMP	monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	ácido-*α*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
AP-1	*activator protein 1*; proteína ativadora tipo 1
APC	*antigen presenting cells*; células apresentadoras de antígenos
ASIC	acid-sensing ion channels; canais iônicos sensíveis a ácido
AST	aspartato aminotransferase
ATC	ácido tricloroacético
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	adenosina trifosfato
Aβ	fibra A beta
Aδ	fibra A delta
B1	receptor de bradicinina do tipo 1
B2	receptor de bradicinina do tipo 2
BAFF	*B-cell-activating factor*; fator ativador de células B
Balb/C	camundongos (*Mus musculus*) albinos linhagem Balb/c
BASO	basófilos
BK	bradicinina
C57BL06	camundongos (*Mus musculus*) black linhagem C57BL06
Ca^{2+}	Íons cálcio

CAT	catalase
CBM	concentração bactericida mínima
CC	concentração citotóxica
CCK-2	Colecistoquinina tipo B
CD14	cluster de diferenciação 14; *cluster of differentiation 14*
CD4+	linfócito T auxiliar
CD8+	linfócito T citotóxico
CD40	cluster de diferenciação 40; *cluster of differentiation 40*
CD80	cluster de diferenciação 80; *cluster of differentiation 80*
CD86	cluster de diferenciação 86; *cluster of differentiation 86*
CE	concentração efetiva
CFA	*Complete Freund's Adjuvant*; Adjuvante Completo de Freund
CGRP	gene da calcitonina
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CHO-k1	linhagem celular derivada de *Cricetulus griseus,* epitélio ovariano – ATCC® CCL-61®
CI	concentração inibitória
CIM	concentração inibitória ínima
Cl^-	íon cloreto
CLAE-UV-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta com arranjo de diodos
CLSI	*Clinical & Laboratory Standards Institute*
CO_2	dióxido de carbono
COX-1	ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2	ciclo-oxigenase tipo 1
CREB1	*cAMP-response element-binding protein-1*
CSFs	colony-stimulating fator; fator estimulador de colônias
CXCL1	quimiocina CXC, com especificidade para receptores CXCR2, em células dentríticas e linfócitos T
CXCL2	quimiocina CXC, com especificidade para receptores CXCR2, em monócitos e neutrófilos
CYP_{450}	citocromo P450
DAG	diacilglicerol
DI	dose inibitória
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	dimetilsulfóxido

DNA	*deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico
DPPH	*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*; 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DTNB	*5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*; ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico; Reagente de Ellman
E.P.M.	erro padrão da média
ECD	extrato de *C. duckei*
ECO	extrato de *C. oblongifolia*
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acétic; *ethylenediamine tetraacetic acid*
EI	*electron ionization*; ionização por impacto de elétrons
EOS	eosinófilos
EP	*prostaglandin receptor*; receptor de prostaglandina
EtOH/HCl	solução etanol a 60 % com HCl 0,3 N
Fe^{2+}	íon ferro
gamma-GT ou γ-GT	gamma-glutamiltransferase
Gi	proteína G inibitória
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPx	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
GST	glutationa-S-transferase (),
H^+	íon hidrogênio
H^+, K^+-ATPase	enzima hidrogênio-potássio-ATPase; bomba de prótons
H_1	receptor de histamina do tipo 1
H_2	receptor de histamina do tipo 2
H_2CO_3	ácido carbônico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_3PO_4	ácido Fosfórico
HAM-F12	*Ham's F-12 Nutrient Mixtures*
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCO_3	bicarbonato
HCO_3^-	íon bicarbonato
HCT	hematócrito
HeLa	linhagem celular derivada de *Homo sapiens,* carcinoma de colo de útero – ATCC® CCL2®

HGB	hemoglobina
$HO^{\bullet}$	radical hidroxila
HOCl	ácido hipocloroso
I.A.S.P.	*International Association for the Study of Pain*
i.p.	via intra-peritonial
i.pl.	via intra-plantar
ICAM-1	*intercellular adhesion molecule 1*; molécula de adesão intercelular-1
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IL	Interleucina; *interleukin*
IL-1	interleucina 1; *interleukin 1*
IL-10	interleucina 10; *interleukin 10*
IL-12	interleucina 12; *interleukin 12*
IL-13	interleucina 13; *interleukin 13*
IL-16	interleucina 16; *interleukin 16*
IL-18	interleucina 18; *interleukin 18*
IL-1β	interleucina 1 beta; *interleukin 1 beta*
IL-2	interleucina 2; *interleukin 2*
IL-4	interleucina 4; *interleukin 4*
IL-5	interleucina 5; *interleukin 5*
IL-6	interleucina 6; *interleukin 6*
IL-8	interleucina 8; *interleukin 8*
INF	interferon
INF-α	interferon alfa
INF-β	interferon beta
INF-γ	interferon gamma
IP_3	trifosfato inositol
IRF3	*interferon-regulatory fator 3*; fator regulador 3 do IFN
IRFs,	interferons
IκB	proteína inibitória kappa B
K^+	íon potássio
KC	quimiocina KC

KCl	cloreto de potássio
KH_2PO_4	fosfato monopotássico; hidrogenofosfato de potássio
L929	linhagem celular derivada de *Mus musculus*, tecido conjuntivo subcutâneo; areolar e adiposo - fibroblasto, NCTC clone 929 [L cell, L-929, *derivative of Strain L*] – ATCC® CCL-1®,
LBP	proteínas ligante de LPS; *Lipopolysaccharide Binding Protein*
LIN	linfócitos
L-NAME	L-metil-arginina-éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LTα	linfotoxina α
M100-S16	suplemento do M7-A7
M_3	receptor muscarínico tipo 3
M7-A7	*Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*
MAPK	*mitogen activated protein kinases* - proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	*monocyte chemoattractant protein-1*; proteína quimiotática de monócitos-1
MD-2	proteína mieloide diferenciadora tipo 2
MDA	malondialdeído
mEq	miliequivalente; peso molecular em mg, dividido pela valência/peso atômico
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
MHC	*major histocompatibility complex*; complexo principal de histocompatibilidade
MONO	monócitos
MPO	mieloperoxidase; peróxido de hidrogênio oxidoredutase
Na^+	íon sódio
Na^+, K^+ ATPase	enzima sódio-potássio-ATPase
Na_2HPO_4	fosfato dissódico; hidrogenofosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
NEU	neutrófilos
NF-κB	fator nuclear kappa B; *factor nuclear kappa B*
NFκB1	fator nuclear kappa B tipo 1; *factor nuclear kappa B1*

NFκB2	fator nuclear kappa B tipo 2; *factor nuclear kappa B2*
NGF	*nerve growth fator*; fator do crescimento do nervo
NLS	*nuclear localization signals*; sinal de localização nuclear
NMDA	*N*-metil-*D*-aspartato
NO	óxido nítrico
NOSi	enzima sintase de óxido induzível
O_2	oxigênio
$O_2^{\bullet -}$	ânion superóxido
OCD	oleorresina de *C. duckei*
OCO	oleorresina de *C. oblongifolia*
OECD	*Organisation for Economic Co-operation and Development*
OECD	*Organisation for Economic Co-operation and Development*
OMS	Organização Mundial da Saúde
P2X3	receptor purinérgico
PAF	fator de agregação plaquetária
PBS	*phosphate-buffered saline;* tampão fosfato salino
PECAM-1	*platelet endothelial cell adhesion molecule*; molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PGE_2	Prostaglandina E_2
PGI_2	prostaciclina
PGN	peptídeoglicano
PGs	prostaglandinas
pH	escala para medida do potencial hidrogeniônico
PI	iodeto de propídio
Pi	fósforo inorgânico
PLA2	fosfolipase A2
PLA_2	enzima fosfolipase A_2
PLT	número total de plaquetas
pNF-κB-Luc	gene repórter luciferase em resposta a expressão de NF-κB;
PSA	*penicillin-streptomycin-amphotericin B*; penicilina/estreptomicina/anfotericina
®	registrado; marca registrada
RAW 264.7-Luc	linhagem celular derivada de *Mus musculus,* macrófago proveniente de tumor de Abelson induzido por vírus, geneticamente modificado – ATCC® TIB-71®
RBC	*red blood cells*; número total de hemácias

RDW	*red cell distribution*
RNAm	*messenger ribonucleic acid*; ácido ribonucleico mensageiro
ROS	*reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
RPMI-1640	*Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*
s.c.	via subcutânea
SAC	Serviço de Análises Clínicas
SFB	soro fetal bovino
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
STAT	*signal tranducer and activator of transcription;* transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TBA	*2-thiobarbituric acid*; ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	*thiobarbituric acid reactive substances*; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Th0	células T *helper* em repouso
Th1	células T *helper* tipo 1
Th2	células T *helper* tipo 2
THP-1	linhagem celular derivada de *Homo sapiens,* monócitos de sangue periférico de leucemia monocítica aguda – ATCC® TIB-202®
TLR	receptor *Toll-like*
TLR2	receptor *Toll-like* tipo 2
TLR4	receptor *Toll-like* tipo 4
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa; *tumor necrosis factor alpha*
TNT	*Tris-HCl-Tween buffer*; tampão Tris-HCl-Twenn
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TRPV	*transient receptor potential cation channels*; receptor vaniloide
TRPV1	*transient receptor potential cation channels type 1*; receptor vaniloide tipo 1
TSA	*trypticase soy agar*; ágar triptona de soja
TSB	*trypticase soy broth*; caldo triptona de soja
UFC	unidades formadoras de colônia
UHPLC-(ESI)-HRMS	ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to ESI(+)-HRMS(n) method

UV	ultravioleta
v.o.	via oral
VPM	volume plaquetário médio
WBC	*white blood cells*; número total de leucócitos
XOD	xantina oxidase

SUMÁRIO

RESUMO ..... **X**

ABSTRACT ..... **XIII**

LISTA DE FIGURAS ..... **XVI**

LISTA DE TABELAS ..... **XXIV**

LISTA DE EQUAÇÕES ..... **XXVIII**

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS ..... **XXIX**

SUMÁRIO ..... **XXXVII**

1 INTRODUÇÃO **42**

2 OBJETIVOS **46**

2.1 Objetivo geral 46

2.2 Objetivos específicos 46

3 REVISÃO DE LITERATURA **48**

1.1 O uso de plantas medicinais 48

1.2 Das espécies em estudo de *Copaifera* 48

1.3 Fisiopatologia da úlcera gástrica 51

1.4 Fisiopatologia da dor e a inflamação 53

4 MATERIAIS E MÉTODOS **56**

4.1 Coleta do oleorresina e folhas das espécies *Copaifera* 56

4.1.1 Preparo dos extratos brutos das folhas *57*

4.1.2 Preparo das partições a partir do extrato bruto hidroalcoólico das folhas *57*

4.2 Análises cromatográficas 59

4.2.1 Análise da composição das oleorresinas de C. oblongifolia e C. duckei por CG-EM *59*

4.2.2 Análise qualitativa (desreplicação) das oleorresinas, extratos e partições das folhas de C. oblongifolia e C. duckei *59*

4.3 Ensaios toxicológicos e farmacológicos 63

4.3.1 Delineamento experimental *63*

4.3.2 Manutenção das linhagens celulares *64*

4.3.3 Animais 65

4.4 Avaliação da atividade toxicológica 66

4.4.1 Citotoxidade em linhagem celular imortalizada CHO-k1 e L929..... 66

4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda dose única in vivo – 14 dias e avaliação da toxicidade sub-crônica doses repetidas in vivo – 90 dias..... 67

4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora..... 69

4.5.1 Avaliação da atividade gastroprotetora in vitro 69

4.5.2 Avaliação da atividade gastroproterora sob úlceras agudas 71

4.5.3 Avaliação da atividade gastroproterora sob úlceras crônicas..... 72

4.5.4 Avaliação da atividade sobre a secreção gástrica 74

4.5.5 Atividade anti-Helicobacter pylori..... 76

4.5.6 Mecanismos de ação gastroprotetora antioxidante in vitro..... 78

4.5.7 Inibição da óxido nítrico sintase (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) in vivo 81

4.5.8 Determinação da atividade da Glutationa S- Transferase (GST), Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), óxido nítrico (NO) e malondialdeídeo (MDA) na Região Glandular Gástrica..... 81

4.5.9 Mecanismos de ação gastroprotetora anti-inflamatória 83

4.5.10 Mecanismos de ação gastroprotetora anti-secretória 84

4.6 Avaliação da atividade antinociceptiva 85

4.6.1 Avaliação da atividade sob o sistema nervoso central 85

4.6.2 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória..... 87

4.6.3 Modelos de nocicepção aguda 87

4.6.4 Modelos de hiperalgesia 88

4.6.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória..... 92

4.7 Análise Estatística..... 98

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 100

5.1 Rendimento das coletas da oleorresina das espécies de *Copaifera* spp. 100

5.2 Rendimento dos extratos hidroalcoólicos e partições das espécies de *Copaifera* spp. 100

5.2.1 Análise da composição das oleorresinas de C. oblongifolia e C. duckei por CG-EM 101

5.2.2 Análise qualitativa (desreplicação) das oleorresinas, extratos e partições das folhas de C. oblongifolia e C. duckei 104

5.3 Avaliação da atividade toxicológica 111

5.3.1 Efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares CHO-k1 e L929..... 111

5.3.2 Efeitos tóxicos observados no teste de toxicologia aguda dose única in vivo – 14 dias e no teste de toxicidade sub-crônica doses repetidas in vivo – 90 dias 118

5.4 Avaliação da atividade gastroprotetora..... 135

5.4.1 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. sobre células AGS e sobre o ensaio curativo in vitro em células L929 135

5.4.2 Efeitos gastroprotetores das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. úlceras agudas..... 145

5.4.3 Efeitos gastroprotetores das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. úlceras crônicas 155

5.4.4 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera sobre a secreção gástrica e a quantidade de muco gástrico (ligadura de piloro) 159

5.5 Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori*..... 161

5.5.1 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bacteriana mínima (CBM) 161

5.5.2 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre animais infectados por Helicobacter pylori submetidos à úlceras crônicas por ácido acético 162

5.5.3 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade antioxidante in vitro..... 164

5.5.4 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a inibição do óxido nítrico sintase (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) in vivo 167

5.5.5 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade da glutationa S- transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e níveis de óxido nítrico (NO) na região glandular gástrica 170

5.5.6 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na região glandular gástrica..... 173

5.5.7 Efeito das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade da enzima H^+, K^+-ATPase 175

5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva..... 180

5.6.1 Efeito das oleorresinas, extratos das folhas de Copaifera spp. e do ácido poliáltico sobre atividade sob o sistema nervoso central..... 180

5.6.2 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre contorções abdominais 183

5.6.3 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre a nocicepção espontânea produzida por formalina 187

5.6.4 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre a nocicepção térmica através do teste de retirada da cauda (Tail-Flick) 193

5.6.5 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia mecânica 196

5.6.6 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia mecânica associada à avulsão de plexo braquial (APB)..... 214

5.6.7 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre o edema de pata.... 221

5.6.8 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico no exudato da bolsa de ar (Air pouch) 232

5.6.9 Efeito da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia inflamatória induzida CFA..... 243

5.6.10 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. sobre células THP-1 248

5.6.11 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. sobre a concentração de interferon gama (INF-γ), interleucina 1-beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e em sistema multi-spot em células THP-1 252

5.6.12 Efeitos da oleorresina de C. duckei e do ácido poliáltico sobre atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc 264

6 CONCLUSÃO..... 270

REFERÊNCIAS..... 277

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO PARA A COLETA DA *C. OBLONGIFOLIA* . 329

ANEXO II - TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA BIOPROSPECÇÃO DO SISBIO/IBAMA330

ANEXO III - TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO* 332

ANEXO IV – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO 333

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Ao Brasil atribui-se uma das maiores biodiversidades vegetais do mundo, sendo que a utilização de plantas com fins medicinais é realizada quase sem comprovação científica de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, bem como sem o conhecimento dos metabólitos secundários (MACIEL et al., 2002; VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O registro de medicamentos preparados com plantas medicinais ainda é pequeno, o que revela o pouco aproveitamento da biodiversidade do país e da riqueza de suas plantas com potencial farmacológico. Neste sentido, muitas plantas que são utilizadas popularmente com finalidade terapêutica continuam sem validação científica (FENNER et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2008).

Atualmente, as universidades concentram a maioria dos estudos com plantas medicinais (MONTANARI; BOLZANI, 2001) Porém, a tendência de mercado, diante do desenvolvimento de fitoterápicos como o *Acheflan*® (*Cordia verbenacea*) e o *Sintocalmy*® (*Passiflora incarnata*), é associar pesquisas e o conhecimento acadêmico ao investimento e empreendedorismo de indústrias farmacêuticas nacionais. Esta tendência agrega valores farmacológicos na biodiversidade da flora brasileira e certamente promoverá o crescimento da indústria farmacêutica nacional, permitindo ao Brasil se destacar na produção de fitoterápicos a nível mundial e, principalmente, evoluir na química medicinal em busca de substâncias puras isoladas a partir de produtos naturais (CECHINEL-FILHO; CAMPOS; YUNES, 2003; MONTANARI; BOLZANI, 2001; PINTO et al., 2002; YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia vem ao longo dos anos trabalhando com diversas plantas, tais como: *Baccharis dracunculifolia*, *Copaifera langsdorffii*, *Zanthoxylum naranjillo*, *Nectandra megapotamica*, *Pothomorphe umbellata*, *Tithonia diversifolia*, *Solanum lycocarpum*, bem como a própolis verde, dentre outras plantas.

Dando continuidade a esses trabalhos, o projeto temático intitulado “Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*” tem o propósito de aprofundar os estudos sobre os aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos destas espécies, bem como avaliar as atividades anti-inflamatória, analgésica, imunomodulatória, cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral e

antiparasitária (BASILE et al., 1988; GOMES et al., 2010; SANTIAGO et al., 2015; SOUZA et al., 2011a).

Como já salientado anteriormente, embora de forma breve, além da complexidade dos processos envolvidos nas patologias que envolvem processos dolorosos, inflamatórios e gástricos, a terapia farmacológica não se apresenta totalmente eficaz, com inúmeros efeitos colaterais, o que dificulta a adesão ao tratamento. Plantas como as pertencentes ao gênero *Copaifera*, as quais são amplamente utilizadas pela medicina popular, continuam sem a comprovação científica de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, sem a elucidação dos compostos envolvidos nestas atividades, tornando-se necessários estudos mais aprofundados sobre a segurança e eficácia no uso destas plantas.

Além disso, espécies de *Copaifera* apresentam grande potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que somente a comercialização da oleorresina no ano de 2013 representou a movimentação econômica na ordem de R$ 2,5 bilhão/ano, ou seja, cerca de 150 toneladas/ano (IBGE, 2013). Segundo o banco de dados *SciFinder Scholar* até o momento, existem 70 patentes registradas com copaíba. Estes registros vão desde o uso terapêutico para urolitíase (BRUNHAROTO et al., 2011; BRUNHAROTO; BASTOS; SILVA, 2005), formulações dentais especiais (CUMMINS, 2009), gel oral (SIMÕES, 2006), selante endodôntico (GARRIDO et al., 2006), uso veterinário (ALBUQUERQUE, 2010; PIN, 2007), como anti-inflamatório oral e tópico (BRUNHAROTO; BASTOS; SILVA, 2011; CARVALHO, 2010; CUMMINS, 2009; DE FREITAS et al., 2007; NYKROVA, 2000; SABATER; COURMONTAGNE, 1994), entre outras aplicações, tais como para a produção de cosméticos, incluindo a formação de nanopartículas e polímeros, bebidas e sanitizantes, além de tintas para a construção civil.

Até o momento nas principais bases de dados o termo "*Copaifera*" aparece 138 no *PubMed* da *National Center for Biotechnology Information*, 545 no *Science Direct*, 719 no *Springer Link*, 468 no *Wiley Library* e 161 no *Scielo*. A maioria dos estudos farmacológicos de espécies de *Copaifera* utiliza apenas oleorresina bruta, sendo que os processos cromatográficos de fracionamento são raramente aplicados (BASILE et al., 1988; CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2010, 2007; LIMA et al., 2003b; PAIVA et al., 2002; SANTIAGO et al., 2015; TAPPIN et al., 2004; TRINDADE et al., 2013; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). Nestes estudos farmacológicos é praticamente impossível associar quais são os metabólitos responsáveis pela atividade biológica.

Sendo assim, estudos fitoquímicos são fundamentais para o desenvolvimento de metodologias analíticas visando o controle de qualidade da matéria-prima ou de um futuro fitoterápico (BRASIL, 2004a, 2004b, 2010; CALIXTO, 2000; PINTO et al., 2002).

Além disso, a maioria destes estudos não apresenta a correta identificação botânica da espécie estudada, bem como a época e local de coleta (MACIEL et al., 2002). Em muitos trabalhos o óleo é adquirido comercialmente, o que pode apresentar incertezas quanto à autenticidade e qualidade, devido à prática de mistura de diferentes oleorresinas e adulteração de material vegetal (MACIEL et al., 2002; VASCONCELOS; GODINHO, 2002; VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Dentro deste contexto, este trabalho busca avaliar e compreender o mecanismo envolvido nos processos de citoproteção e cicatrização de úlceras gástricas, os processos anti-inflamatórios e analgésicos, atribuídos popularmente e previamente descritos na literatura (GOMES et al., 2010, 2007; LUCCA et al., 2015; PAIVA et al., 1998; SANTOS et al., 2008; VARGAS et al., 2015; VEIGA-JUNIOR et al., 2006; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007) da oleorresina das copaíbas, *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer, as quais não apresentam ou possuem poucos estudos farmacológicos descritos na literatura. Porém, para um maior entendimento das propriedades químicas e farmacológicas dessas espécies, extratos das folhas também serão utilizados neste estudo, bem como o emprego de diversas técnicas de separação cromatográfica na busca de substâncias puras responsáveis por essas atividades, buscando também avaliar seu mecanismo de ação.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Propõem-se o estudo toxicológico e farmacológico – *in vitro* e *in vivo* – da oleorresina, extrato bruto das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. (*C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer).

2.2 Objetivos específicos

- Coletar a oleorresina e as folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, obter extrato bruto das folhas, realizar o fracionamento e obter princípios ativos tanto das folhas quanto da oleorresina;
- Obter o perfil químico da oleorresina e dos extratos hidroalcoólico das folhas de *Copaifera* spp. por CG-MS, CLAE-UV-DAD e UHPLC-(ESI)-HRMS;
- Avaliar as atividades citotóxicas *in vitro* através da determinação da viabilidade celular indireta e da morte celular por citometria de fluxo;
- Avaliar as atividades toxicológicas *in vivo*, nos ensaios de toxicidade aguda por dose única (14 dias) e de toxicidade subcrônica em doses repetidas por 90 dias;
- Avaliar a atividade citoprotetora e cicatrizante sobre úlceras gástricas, tanto em modelos de indução de úlceras agudas quanto crônicas;
- Avaliar as atividades anti-*Helicobacter pylori*, *in vitro* e *in vivo*;
- Verificar se há interferência função e coordenação motora dos animais, através dos testes de Campo Aberto (*Open-field*) e *Rota Rod*;
- Investigar as atividades farmacológicas antinociceptivas e anti-inflamatórias, tanto sobre dor aguda quanto crônica, *in vitro* e *in vivo*;
- Investigar preliminarmente os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades citoprotetoras e cicatrizantes gástricas, anti-inflamatórias e antinociceptivas.

Revisão de literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O uso de plantas medicinais

O uso de plantas como recurso terapêutico é uma prática antiga, que acompanha a evolução da humanidade. Até os dias atuais, a utilização de plantas pela população, em sua maioria, baseia-se no emprego empírico, sendo que as plantas jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (BRESOLIN; CECHINEL-FILHO, 2003; HEINRICH; GIBBONS, 2001; MIGNANI et al., 2016). Neste contexto, surge a necessidade de estudar plantas empregadas popularmente, com o propósito de captar informações na procura de substâncias biologicamente ativas que possam ser utilizadas na produção de medicamentos (ALBUQUERQUE et al., 2007; ARAÚJO et al., 2016; DI STASI et al., 2002).

Diante dos avanços tecnológicos da química e da biologia moderna, sabemos que a atividade farmacológica atribuída às plantas é resultante da ação dos seus metabólitos secundários (BALUNAS; KINGHORN, 2005; GURIB-FAKIM, 2006; HARVEY, 2008; RISHTON, 2008). Ano após ano, as pesquisas de novos fármacos originados de produtos naturais estão crescendo, tendo em vista que os fármacos disponíveis no mercado nem sempre são eficazes diante das necessidades terapêuticas atuais (PARK, 2016; RASKIN et al., 2002).

1.2 Das espécies em estudo de *Copaifera*

O gênero Copaifera pertence à família Leguminosae Juss., sub-família Caesalpinioideae Kunth. Apresentam-se em 72 espécies, sendo que 17 destas espécies são endêmicas do Brasil (LIMA-NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008; ROMERO, 2007; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). São conhecidas como “copaíbas, copaibeiras, copaívas ou pau d’oleo” (**Figura 1, A**). Seu nome tem origem do tupi “cupa-yba”, que significa “árvore de depósito”, e as suas propriedades medicinais do seu óleo eram bastante difundidas entre os índios latino-americanos (VEIGA-JÚNIOR et al., 2001; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Distribuem-se na América Latina e África Ocidental, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, são facilmente encontradas na região norte e centro-oeste, porém está distribuída em todo o território (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002)

O bálsamo, óleo de copaíba ou oleorresina, são encontrados em canais secretores presente em toda a planta, sendo mais saliente no tronco, de onde é extraído (**Figura 1, B**) (TAPPIN et al., 2004; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Acredita-se que seja um produto de excreção ou desintoxicação da planta, e sua função é de defesa contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982; NOGUEIRA-NETO et al., 2011).

Figura 1. (A) Aspecto geral de uma copaibeira (*Copaifera* spp.). **(B)** Detalhe da oleorresina e das folhas de *Copaifera* spp.
Fonte: (A), a autora.
(B) http://oleo-copaiba.com/img/oleo_de_copaiba_para_cicatrizacao/oleo_de_copaiba_cicatrizacao.jpg

Quimicamente, o oleorresina pode ser definido como uma solução de ácidos diterpênicos em um óleo essencial, contendo grandes quantidades de sesquiterpenos (CASCON; GILBERT, 2000). Até o momento já foram isolados e caracterizados aproximadamente 30 diferentes estruturas químicas de diterpenos da classe dos labdanos e clerodanos, e identificados mais de 70 hidrocarbonetos sesquiterpênicos (LIMA-NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008; TAPPIN et al., 2004; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007).

Dos diterpenos isolados e identificados, o ácido copálico é o único presente em todas as amostras de oleorresina analisadas (VEIGA-JÚNIOR; PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Em outros estudos os sesquiterpenos β-cariofileno, α-copaeno, α-humuleno, β-bisaboleno, α e β-selineno e δ-cadineno foram descritos na maioria dos oleorresinas estudados (SOUSA et al., 2011; SOUZA et al., 2011b; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002).

O oleorresina de copaíba destaca-se por sua importância econômica e extensivo uso popular (VEIGA-JÚNIOR; PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). Dentre as indicações populares, seja por via oral ou tópica, as mais relatadas são como anti-inflamatório, cicatrizante e antimicrobiano (GOMES et al., 2007; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Também são empregadas para doenças das vias urinárias, respiratórias, da pele, como cicatrizante de úlceras, antitumoral, anti-herpético, para cólicas menstruais, feridas uterinas e leucorreia, além de ser usados no tratamento de leishmaniose, paralisias, dores de cabeça e picada de cobra (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). A atividade anti-inflamatória é a mais pesquisada no meio científico (BASILE et al., 1988; CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2010; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007).

Quanto as partes aéreas das copaíbas (**Figura 1, B**), existem poucos estudos com relação à composição química e suas atividades farmacológicas. Em estudos preliminares realizados no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, observa-se que a composição das partes aéreas difere muito do oleorresina, sendo constituído majoritariamente de compostos polares derivados da via do ácido chiquímico, incluindo flavonóides e derivados do ácido gálico (FURTADO et al., 2015; NOGUEIRA; FURTADO; BASTOS, 2015).

1.3 Fisiopatologia da úlcera gástrica

A perda circunscrita de tecido da mucosa nas regiões do trato digestivo que estão em contato com o suco gástrico secretado no estômago é caracterizada como úlcera gástrica (CHANG; LEUNG, 2014; KVIETYS; YAQINUDDIN; AL KATTAN, 2014; RIBEIRO et al., 2016). Frequentemente é uma doença crônica, podendo persistir por até 20 anos, apresentando episódios de cura e reincidência(NAIK et al., 2007; SILVA; FILIPE; PINHO, 1990). É uma doença cada vez mais comum na população mundial atingindo cerca de 10% da população dos países industrializados (BLASER; CHYOU; NOMURA, 1995; GRAHAM, 2014; SVANES, 2000; THORSEN et al., 2013).

Apresenta gênese multifatorial, dependente de alterações endógenas e de estímulos exógenos. Dentre os fatores exógenos, se destacam: 1) os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que inibem a produção de PGs, com consequente aumento na liberação de ácido gástrico e diminuição da produção do muco citoprotetor, acarretando surgimento de lesões (TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013; WALLACE, 2008); 2) o álcool, que promove distúrbios na mucosa, como isquemia e geração de radicais livres, degranulação de mastócitos, inibição da produção de PGs e diminuição na produção do muco (HANSSON et al., 1996; MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009); 3) a infecção por *Helicobacter pylori*, que ocasiona uma resposta inflamatória persistente com liberação de citocinas, PGs e leucotrienos, em resposta à infecção (BLASER; CHYOU; NOMURA, 1995; DUNN; COHEN; BLASER, 1997); 4) a reação secundária a isquemia e reperfusão, que é dependente da geração de radicais de oxigênio e de resposta inflamatória (GRACE, 1994; GRISHAM; GRANGER, 1988; MARD et al., 2015; OTAMIRI; SJÖDAHL, 1991).

Os fatores endógenos compreendem doenças associadas ou alterações da mucosa provocadas por estresse que resultam na hipersecreção gástrica (MOJŽIŠ; HEGEDÜŠOVÁ; MIROSSAY, 2000; WALLACE, 2008). Neste contexto podemos destacar a síndrome de Zollinger-Ellison, caracterizada por tumor secretor do hormônio gastrina (gastrinoma), que causa hipersecreção de ácido gástrico (WILCOX; HIRSCHOWITZ, 2009). Já no estresse, o mecanismo sugerido é aumento da peroxidação lipídica das células epiteliais pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (OTAMIRI; SJÖDAHL, 1991)

Independente do fator indutor, a úlcera gástrica é resultante do desequilíbrio entre a produção do ácido gástrico e os fatores de proteção produzidos pelas células

do trato gastrointestinal. O resultado é a necrose das células epiteliais e inflamação local, com migração de neutrófilos em resposta ao tecido lesado. Num primeiro momento, os neutrófilos atuam como agentes de defesa, protegendo o organismo de possíveis infecções sistêmicas. No entanto, as células secretam e liberam uma variedade de agentes químicos que contribuem para a lesão. Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF-α) e interleucinas (IL-1β, IL-6) podem ser quantificadas na circulação como indicadores de inflamação durante a úlcera. Assim sendo, o *clearance* de neutrófilos do tecido gástrico é fator importante na restauração tecidual (KWIECIEŃ et al., 2004; WALLACE; MA, 2001; WALLACE, 2008).

A primeira linha de defesa endógena é a barreira de muco e bicarbonato, exercida pela mucosa gástrica e composta por um gel de muco, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes. O muco desempenha papel estrutural importante na criação de uma camada que retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais, proporcionando um ambiente com pH próximo a neutralidade, atuando como uma barreira física contra a ação da pepsina e ácido clorídrico (ALQASOUMI et al., 2009; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; WALLACE, 2008; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ROS pelas oxidases de mucosa, como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase (ADZU et al., 2015; GRISHAM; GRANGER, 1988; SANTOS et al., 2012).

Em geral, o ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células impede os danos causados pelos radicais livres. Este ambiente redox é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa. Além disto, outros fatores podem acarretar o aumento da produção de ROS como, por exemplo, o processo inflamatório (KEMMERLY; KAUNITZ, 2013; OZBAYER et al., 2014; YOSHIKAWA et al., 1993). Alterações no estado redox e depleção de antioxidantes pela exposição a agentes oxidantes levam ao estresse oxidativo (BAGCHI; BHAITACHARYA; STOHS, 1996; DEN HARTOG et al., 2016; KWIECIEŃ; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002).

Além da inibição do potencial oxidativo, as células epiteliais secretam prostaciclina (PGI_2) e, principalmente, a prostaglandina E_2 (PGE_2), que são essenciais na manutenção da integridade gástrica e na proteção contra agentes ulcerosos. As

PGs inibem a liberação de ácido gástrico, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, estimulam a produção de muco e bicarbonato, aceleram o reparo e a cicatrização tecidual (BRZOZOWSKI, 2003; WALLACE, 2008). Estes fatores favorecem a manutenção da integridade tecidual e a rede microcirculatória e, consequentemente a perfeita perfusão sanguínea. Em conjunto, contribuem para evitar o dano das camadas epiteliais mais profundas da mucosa (MOJŽIŠ; HEGEDÜŠOVÁ; MIROSSAY, 2000; WALLACE; MILLER, 2000; WALLACE, 2008).

1.4 Fisiopatologia da dor e a inflamação

O sistema sensorial é responsável pelo processamento dos estímulos provenientes do meio ambiente externo e interno do organismo, possuindo o papel de detectar e desencadear reações frente a estes. Dentro da evolução genética, as substâncias transdutoras especializaram este sistema, diferenciando o estímulo agressivo do inócuo, facilitando a condução nervosa e evitando situações desagradáveis, mantendo as funções fisiológicas e preservando a vida (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006; LEGRAIN et al., 2011; MILLER; WALLIS, 2010).

Este sistema capacita o indivíduo à nocicepção e a dor. Em termos fisiológicos, há diferença entre nocicepção e dor. A nocicepção está relacionada com manifestações neurofisiológicas, geradas por um estímulo nocivo, enquanto que a dor envolve o estímulo potencialmente nocivo, possuindo conotação individual e é representada por experiências subjetivas, que incluem fatores afetivos, emocionais e sociais (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; MILLAN, 1999, 2002).

Segundo a I.A.S.P. (*International Association for the Study of Pain*), a dor pode ser definida como sendo “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial”, ou seja, uma sensação desagradável, criada por um estímulo nocivo ou não, que atinge o sistema nervoso central e periférico (BRUEHL et al., 1999; CARR; GOUDAS, 1999; JENSEN et al., 2011; LOESER; TREEDE, 2008).

Já a inflamação é uma resposta proveniente de um estímulo primariamente doloroso, que envolve eventos celulares e bioquímicos de alta complexidade, incluindo o extravasamento de fluidos, ativação de receptores, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo celular. Neste caso, a transmissão dolorosa é um mecanismo dinâmico e envolve diversos

mediadores que interagem com as estruturas do sistema nervoso central e periférico em toda a sua extensão, desde os nociceptores até o córtex cerebral (BLACK, 2002; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; DENG; CHANG; LU, 2016; LEE, 2013; LILES; VAN VOORHIS, 1995; SHEFFIELD, 1990).

A inflamação é uma reação frente a uma agressão local, ou seja, é a maneira como o organismo se defende de uma lesão tecidual causada por agentes físicos, químicos e/ou biológicos. Assim, a inflamação e a dor, tem função de alertar e reparar o tecido (ALESSANDRI et al., 2013; LIEW; MCINNES, 2001; LIEW, 2003; ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013).

O processo inflamatório se divide de acordo com o critério temporal, podendo ser aguda ou crônica. A inflamação aguda é de curta duração, (horas ou dias) caracterizada por vasodilatação arteriolar e venular, edema e migração de células, podendo ativar a cascata de coagulação (BLACK, 2002; MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A fase crônica da inflamação é sempre precedida da inflamação aguda, tem duração mais longa (semanas, meses ou anos), e se caracteriza por migração leucocitária e sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva (ALESSANDRI et al., 2013; BLACK, 2002; MEDZHITOV, 2008).

A dor inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos, através da participação de mediadores inflamatórios, como a histamina, a PGs, as interleucinas (IL), óxido nítrico (NO), em primeiro momento, e posteriormente com a manutenção da resposta inflamatória através da liberação de bradicinina, leucotrienos, substância P, componentes do sistema complemento, entre outros (BUENO et al., 1997; GRUBB, 1998; GUIMARÃES et al., 2010; GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; HIURA; NAKAGAWA, 2012; MILLAN, 1999; MOLLACE et al., 2005).

Uma vez que a dor e a inflamação são processos biológicos nos quais muitos mediadores co-participam, alguns medicamentos analgésicos também exibem propriedade anti-inflamatória. O tratamento da dor e da inflamação deve seguir a sua etiologia, pois a resposta dos fármacos difere com o tipo de mecanismo que desencadeia o processo doloroso (MCDOUGALL, 2006; MILLAN, 1999; SMITH et al., 1998).

Material e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do oleorresina e folhas das espécies *Copaifera*

A coleta das folhas e da oleorresina de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne foi realizada no mês de junho de 2012, pelo Prof. Dr. Rodrigo Cassio Sola Veneziani, na Usina Santo Ângelo, situada no município de Pirajuba, Minas Gerais (19º 56.833'S 48º 33.504'O). O material vegetal foi extraído com o consentimento do Diretor Agrícola, Pedro de Paula Guidi, do Diretor Industrial, José Manoel Gomes e dos responsáveis pelo Departamento de Meio Ambiente, Decriê Polastrine e Arthur Borges Jacob (**Anexo I**). Um exemplar foi submetido à análise botânica pelo Prof. Milton Groppo Junior do Herbário do Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, sendo depositada e registrada sob o número SPFR 14437.

A coleta das folhas e da oleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer foi realizada pelo Prof. Dr. Herve Louis Ghislain Rogez e pelo Me. Jonas Joaquim Mangabeira da Silva, da Universidade Federal do Pará, no distrito de Mosqueiro, no município de Belém, Pará (19º 56.833'S 48º 33.504'O). Um exemplar do material vegetal está depositado e registrado sob o número NID: 96/2012, sendo sua taxonomia validada pela botânica Dra. Silvane Tavares Rodrigues, da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, EMBRAPA, Belém, Pará.

Todas as coletas foram realizadas sob a autorização para bioprospecção do SISBIO/IBAMA n. 35143-2 (**Anexo II**).

Para a coleta da oleorresina das duas espécies de *Copaifera* utilizou-se um perfurador manual (trado, medindo 1,2 m de comprimento e 2 cm de diâmetro). As árvores possuem diâmetro acima de 30 cm, sendo que o orifício realizado atingiu o centro do interior do tronco, e foi realizada a uma altura de cerca de um metro acima do solo (MEDEIROS; VIEIRA, 2008). Para facilitar as posteriores coletas foi adaptada uma torneira ao orifício do tronco das árvores.

As folhas coletadas foram separadas dos ramos e galhos, submetidas à secagem em estufa de ar quente e circulante a 40 °C, sendo posteriormente trituradas em moinho de facas.

4.1.1 Preparo dos extratos brutos das folhas

O pó obtido após moagem das folhas de *C. oblongifolia* (1000 g) foi submetido à maceração em solução hidroalcoólica 70%, seguida de percolação, por cinco vezes, a cada 48 horas. As soluções hidroalcoólicas foram filtradas, transferidas progressivamente para balões de fundo redondo e concentradas sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotativo e banho de aquecimento com temperatura de 40±5 ºC (Fisatom, modelo 801; Freiburg im Breisgau, Alemanha). Após a redução, utilizou-se liofilizador (Liotop, modelo K105, São Carlos, Brasil), para finalização do extrato, que foi transferido para frasco previamente pesado para a determinação do seu rendimento. Para obtenção do extrato das folhas de *C. duckei,* uma alíquota (300 g) do pó das folhas foi submetida ao mesmo processo descrito acima para a *C. oblongifolia*.

4.1.2 Preparo das partições a partir do extrato bruto hidroalcoólico das folhas

Parte do extrato hidroalcoólico (50 g) foi ressuspendido em 400 mL de solução de metanol e água, na proporção 9:1 e, em seguida, particionado com solventes de polaridades crescentes: *n*-hexano, diclometano, acetato de etila, *n*-butanol, obtendo-se as respectivas frações orgânicas e aquosa (**Figura 2**). Cada fração foi concentrada em rotaevaporador, transferida para um frasco devidamente pesado e liofilizada, sendo posteriormente mantido em dessecador até o momento de sua utilização. A diferença gravimétrica foi calculada para a determinação dos rendimentos (%) das partições obtidas.

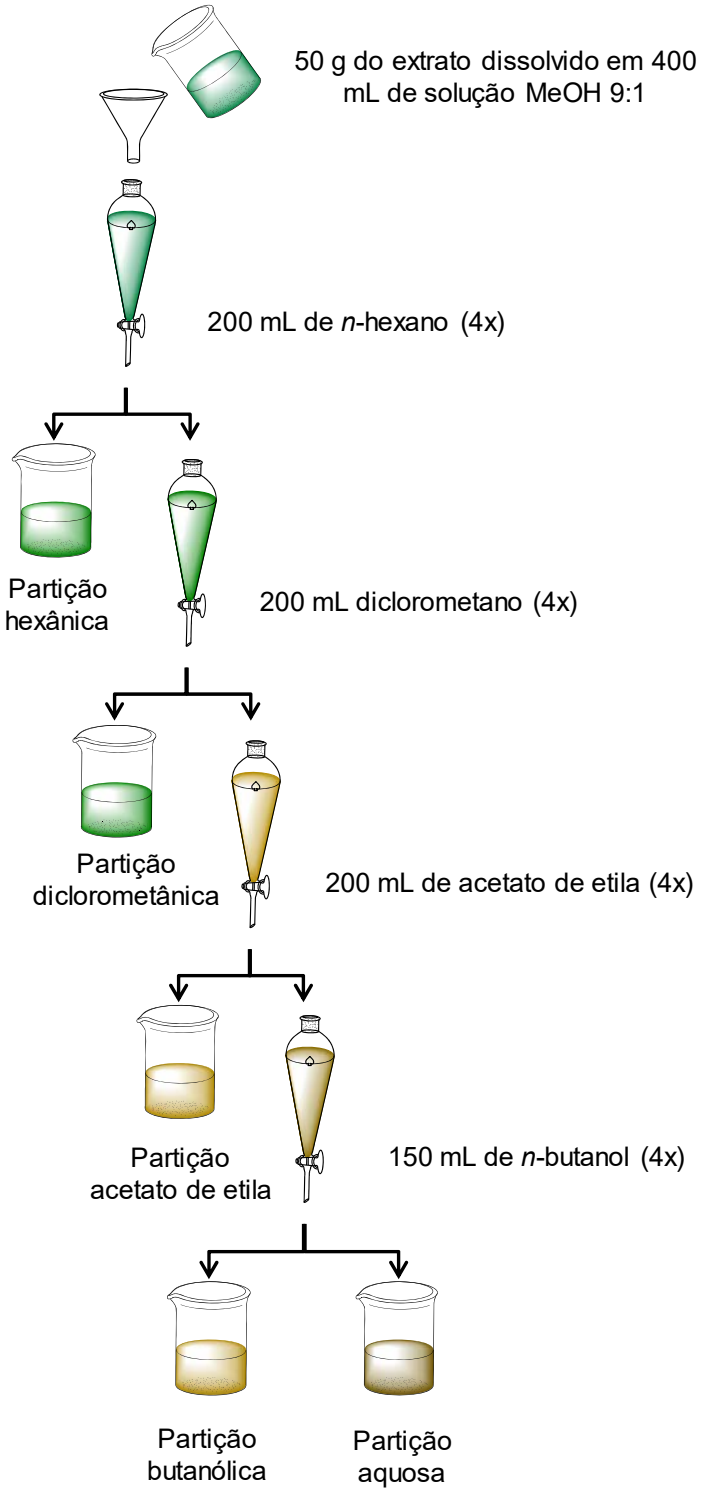


Figura 2. Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos hidroalcoólico das folhas das espécies de *Copaifera* spp.
Fonte: a autora, editado em *software* "ChemBioDraw® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 12.0, 2007 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

4.2 Análises cromatográficas

4.2.1 Análise da composição das oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* por CG-EM

As oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* foram analisadas em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas modelo *Gas Chromatograph Mass Spectrometer - Shimadzu*™ (Shimadzu Corporation, Quioto, JPN) - *QP 2010*, utilizando uma coluna DB-5MS (30 m x 0,25 x 0.25 µm) da marca Agilent® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), empregando dois métodos (**A** e **B**) para a análise cromatográfica, diferenciando-se os métodos apenas na rampa de aquecimento: temperatura do forno de 60ºC; temperatura de injeção de 250ºC; modo de injeção *Split* (1:90); vasão na coluna de 1,30 mL/min; gás de arraste – nitrogênio (N_2); rampa de aquecimento de 60 à 240ºC (método A) (ADAMS, 2007) e 60 à 300ºC (método **B**); taxa de aquecimento – 3ºC/min; fonte de ionização – Impacto eletrônico (EI). Através do tempo de retenção dos compostos observados nas amostras e dos alcanos de série homóloga (em **A**: C9 a C25 e, em **B**: C21 a C40), foi possível calcular o Índice de Retenção de van Den Dool e Kratz (1963) para cada componente das oleorresinas, utilizado para se realizar a identificação desses componentes através da comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis nas seguintes bibliotecas de dados espectrais de massas: *Mass spectra of flavors and fragrances of natural and synthetic compounds with retention index, Wiley FFNSC Library, John Wiley & Sons Inc.* (MONDELLO, 2015), *National Institute of Standards and Technology* (NIST Webbook) (LINSTROM; MALLARD, 2014), *The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals* (EL-SAYED, 2014).

4.2.2 Análise qualitativa (desreplicação) das oleorresinas, extratos e partições das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*

Para o desenvolvimento dos métodos analíticos, em primeiro momento foi utilizado cromatógrafo da marca Water® (Waters Corporation, Milford, MA, USA), com sistema de bombas binário do modelo 1525, injetor automático do modelo 2707, detector de arranjo de diodos do modelo 2998 e controlador de temperatura. O sistema é acoplado a um computador contendo o *software* "Empower®" para sistema

operacional Windows (64 bits), versão 3.0, 2010 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Em segundo momento, as amostras foram analisadas por UHPLC-(ESI)-HRMS em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência modelo Thermo® Accela (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), com sistemas da bombas modelo Accela 1250 pump, acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo Accela PDA detecctor e a um espectrômetro de massas modelo Thermo® Exactive Plus com analisador do tipo Orbitrap®. O sistema é acoplado a um computador contendo o *software* "Thermo Xcalibur® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 2.2, 2011 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

O método de ionização utilizado no espectrômetro de massas foi a ionização por *electron-spray* nas seguintes condições: voltagem do spray (modo positivo – 3,6 kV; modo negativo 3,2 kV); temperatura do capilar (modo positivo – 300ºC; modo negativo – 320ºC). O analisador utilizado foi do tipo Orbitrap® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) (ZUBAREV; MAKAROV, 2013).

O primeiro método foi desenvolvido para a análise das oleorresinas, extratos e frações hexânica e diclorometânica dos extratos. A análise utilizou coluna analítica Ascentis Express® C18 (Supelco, Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA) com 100 mm de altura por 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho das partículas de 2,7 µm. O sistema de solventes escolhido para compor a fase móvel foi (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) hidróxido de amônio-metanol-acetonitrila 0,1:89,9:10 no modo de eluição em gradiente (**Tabela 1**). A vazão foi de 0,5 mL/min e a temperatura mantida em 40ºC.

Tabela 1. Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido.

Tempo (minutos)	**Proporção de solventes**	
Ascentis Express C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm)	**A (%)**	**B (%)**
0	45	55
15	3	97
20	3	97
25	45	55
30	45	55

(A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) hidróxido de amônio-metanol-acetonitrila 0,1:89,9:10

Para a análise qualitativa do perfil dos componentes foram pesados 1 mg de cada amostra de oleorresinas, extratos das folhas e partições hexânica e diclorometânica de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e solubilizadas em metanol contendo 40 µg/mL de cumarina como padrão interno, em metanol.

A amostra foi filtrada em membrana com poros de 0,22 µm e analisada por CLAE-UV-DAD, e posteriormente analisada em UHPLC-(ESI)-HRMS.

A amostra contendo somente padrão interno foi injetada 5 vezes, de forma intercalada com as amostras, sob as mesmas condições, a fim de se obter os tempos de retenção relativos à cumarina, e assim utilizá-lo para a identificação de substâncias, por comparação dos tempos de retenção relativos e perfis de absorção no UV, e por massa exata, obtida pelo espectro de massa de alta resolução.

Um segundo método foi desenvolvido em coluna analítica Synergi Polar-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) com 100 mm de altura por 3,0 mm de diâmetro interno e tamanho das partículas de 2,5 µm. O sistema de solventes escolhido para compor a fase móvel foi (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6 no modo de eluição em gradiente (**Tabela 2**). A vazão foi de 0,68 mL/min e a temperatura mantida em 25ºC.

Tabela 2. Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido.

Tempo (minutos)	**Proporção de solventes**	
Coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm)	**A (%)**	**B (%)**
0	90	10
08,33	85	15
29,17	64	36
31,25	0	100
33,33	0	100
35,42	90	10
37,50	90	10

(A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6

Para a análise qualitativa do perfil dos componentes foram pesados 1 mg de cada amostra de extratos das folhas e partições acetato de etila, butanólica e aquosa de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e solubilizadas em metanol contendo 40 µg/mL de ácido ferúlico como padrão interno em etanol 70%. A amostra foi transferida para microtubo, a qual foi particionada com 500 µL de hexano (*clean-up*). A fase inferior/aquosa foi

filtrada em membrana com poros de 0,22 µm e analisada por CLAE-UV-DAD, e posteriormente analisada em UHPLC-(ESI)-HRMS.

A amostra contendo somente padrão interno foi injetada 5 vezes, de forma intercalada com as amostras, sob as mesmas condições, a fim de se obter os tempos de retenção relativos ao ácido ferúlico, e assim utilizá-lo para a identificação de substâncias, por comparação dos tempos de retenção relativos e perfis de absorção no UV, e por massa exata, obtida pelo espectro de massa de alta resolução.

Os dados obtidos pelo UHPLC-(ESI)-HRMS foram convertidos em *software* MSConvert do pacote "ProteoWizard® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 3.0.6002, 2015, (ProteoWizard, Nashville, TN, USA) (CHAMBERS et al., 2012; KESSNER et al., 2008) para o formato mzXML, e separados de acordo com o modo de ionização, uma vez que o espectrômetro de massas utilizado realiza a aquisição simultânea de dados nos modos positivo e negativo.

Após esta etapa, os dados foram processados no *software* "MZmine® para sistema operacional Windows (64 bits)",versão 2.10, 2015 (Boston, MA, USA) (PLUSKAL et al., 2010), (um modo de ionização de cada vez) a fim de se realizar as seguintes etapas: 1) detecção dos picos, 2) filtro de picos, 3) construção dos cromatogramas, 4) deconvolução dos cromatogramas, 5) agrupamento de picos isotópicos, 6) alinhamento dos cromatogramas, 7) preenchimento de falhas nos cromatogramas e 8) busca por adutos. Dentre os parâmetros utilizados para o tratamento de dados no *software* MZmine, destacam-se: nível de ruído – 10^5; função para o formato do pico – Lorentziana extendida; altura mínima do pico – $5x10^5$; e tolerância de m/z – 0,002 m/z ou 5,0 ppm.

Os dados tratados no *software* mzMine foram exportados na forma de tabelas contendo as áreas dos picos, tempo de retenção e massa exata para cada extrato analisado, sendo uma tabela para os dados obtidos no modo de aquisição positivo e outra para os dados do modo negativo. A desreplicação foi realizada com base nas fórmulas moleculares calculadas através da massa exata e do padrão de fragmentação obtidos para os componentes detectados nas oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp.

Para a identificação das substâncias foram utilizados os bancos de dados, *Dictionary of Natural Products*, disponível no endereço eletrônico: http://dnp.chemnetbase.com e *KNApSAcK Family Databases*, disponível no endereço

eletrônico: http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html, além de informações disponíveis em trabalhos na literatura.

4.3 Ensaios toxicológicos e farmacológicos

4.3.1 Delineamento experimental

Este estudo avaliou dos efeitos toxicológicos da oleorresina, do extrato das folhas ou de compostos isolados de *C. oblongifolia* ou *C. duckei in vitro*, sendo investigadas atividades citotóxicas em células não-tumorais (CHO-k1 e L929), bem como em células tumorais (AGS e THP-1), visando complementar os resultados obtidos na investigação da atividade gastroprotetora e anti-inflamatória. Experimentos *in vivo* foram conduzidos para a observação dos efeitos agudos e crônicos.

Os experimentos de cultura celular e microbiológica foram realizados, em parte, no Laboratório de Fotoquimioproteção da Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, no Laboratório de Farmacologia do Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e no exterior sob supervisão da Profa. Dra. Helen Sheridan, na *School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Faculty of Health Sciences, Trinity College Dublin*, Dublin, Ireland, com bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE-CAPES Processo n. BEX 7277/14-8).

Para avaliação do efeito da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera* spp. sobre a citoproteção e cicatrização gástrica, nocicepção e inflamação – aguda e crônica, foram sendo empregados diferentes protocolos de indução da lesão, com base nos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese e fisiopatologia de cada distúrbio. As doses empregadas no *screening* são de 30, 100 e 300 mg/kg da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas.

Visando otimizar o trabalho e diminuir o uso de animais, como observado preliminarmente, a oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e o extrato das folhas de *C. duckei* não apresentaram resultados satisfatórios nos modelos de nocicepção e inflamação. Sendo assim, como a oleorresina de *C. duckei* e seu composto majoritário, o ácido poliáltico apresentaram resultados preliminares mais promissores quanto aos estudos farmacológicos do ponto de vista antinociceptivo e

anti-inflamatório, sendo que estes experimentos foram conduzidos somente com estas amostras, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg.

4.3.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (Maxisafe 2020, Câmara de Segurança Biológica Classe II, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) e mantidas em incubadora de CO_2 a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 (Form® 310 series, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

As linhagens de células CHO-k1 (CHO-K1 ATCC® CCL-61® *Cricetulus griseus,* epitélio ovariano) e L929 (ATCC® CCL-1®, *Mus musculus*, tecido conjuntivo subcutâneo; areolar e adiposo - fibroblasto, NCTC clone 929 [L cell, L-929, *derivative of Strain L*]) em meio DMEM (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA).

A linhagem de células AGS (ATCC® CRL-1739® *Homo sapiens*, adenocarcinoma gástrico) foram cultivadas em DMEM (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA) suplementado com HAM-F12, a linhagem de células THP-1 (ATCC® TIB-202® *Homo sapiens,* monócitos de sangue periférico de leucemia monocítica aguda) foram cultivadas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA) e a linhagem de células RAW 264.7-Luc (ATCC® TIB-71®, *Mus musculus,* macrófago proveniente de tumor de Abelson induzido por vírus, geneticamente modificado chamada de RAW-Luc, que expressa o gene repórter luciferase em resposta a expressão de NF-κB (pNF-κB-Luc) (WANG et al., 2014) foram cultivadas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA). Todas as linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de células de 25 cm^2 com volume de 50 mL ou de 75 cm^2 com volume de 250 mL, e os meios foram suplementados com 10% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina B – PSA), e 1% de L-glutamina, sendo a manutenção foi realizada antes que as células atingissem a confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio de inversão (Leica DM IL Inverted Microscope, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Para a manutenção das células aderidas, o meio foi retirado e o frasco lavado 2x com salina estéril, em seguida, adicionou-se tripsina-EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA). Posteriormente, o meio de cultura suplementado com SFB foi adicionado às células em suspensão para inibição da tripsina. Parte das células foi

removida da garrafa e o volume preenchido com meio suplementado (passagem). Para manutenção de células fez-se apenas a substituição do meio de cultura, adicionando-se cerca de 200 µL da suspensão celular. O restante desta suspensão foi utilizada nos experimentos descritos a seguir.

4.3.3 Animais

Para realização dos experimentos toxicológicos *in vivo* foram utilizados animais *Hamster* chinês (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas, (95±5g), camundongos *Balb/C* e *C57BL06* (*Mus musculus*) machos (20±5g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USPP. Os experimentos de *Open field* e *Rota-rod* foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, sob supervisão da professora Dra. Márcia Maria de Souza. Foram utilizados animais *Swiss* (*Mus musculus*) machos (25±5g) provenientes do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI.

O experimento de atividade *in vitro* sobre a bomba de bomba H+, K+-ATPase foi realizado no Laboratório de Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, sob supervisão do professor Dr. Sérgio Faloni de Andrade. Foram utilizados os estômagos isolados de coelhos albino da Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) machos (2,5±0,3kg) provenientes do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI.

Os *Hamster* e camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno, com dimensões de 49Cx34Lx16Acm, e os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, com dimensões de 80Cx50Lx35Acm, em salas com controle de temperatura (20-24 ºC), umidade natural (40-60%) e ciclos controlados (claro/escuro 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, bem como de acordo com a legislação brasileira vigente de 2012 à 2016 (BRASIL, 2008, 2014; CONCEA, 2015; SBCAL/COBEA, 2010). Os protocolos foram aprovados pelo Conselho de Ética e Pesquisa no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo n.12.1.1018.53.5; **Anexo III**). Nos experimentos de indução de úlcera, os animais foram mantidos em jejum de no máximo 18 horas, e uma grade foi adicionada para

inibir a coprofagia tendo livre acesso a água. Para os demais experimentos houve um jejum máximo de oito horas.

4.4 Avaliação da atividade toxicológica

4.4.1 Citotoxidade em linhagem celular imortalizada CHO-k1 e L929

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 5 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. Após vinte e quatro horas, as células foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg/poço, e os controles positivos com as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 nM/poço, celecoxib e indometacina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h, 72h e 120h. Após os tempos de incubação, as placas foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do teste por fosfatase ácida (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993). As placas foram lavadas com 100 µL de PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 h a 37 ºC, 5% de CO_2 com uma solução de 4-nitrofenil dissódico hexa-hidrato de fosfato, na concentração de 0,0027 g/mL em 0,1 M de acetato de sódio, 0,1% de Triton X-1 00, pH 5,5. Após a etapa de incubação adicionou-se 50 µL de NaOH a 1 M para interromper a reação. A absorvância foi determinada em leitor de microplacas a 405 nm EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrom, Cambourne, CBE, UK).

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a **Equação 1**:

$$\%VC = \frac{(\bar{x}A_{tratado} - \bar{x}ABS_{branco}}{\bar{x}A_{controle\ negativo}}$$

Equação 1. Fórmula para cálculo da porcentagem da viabilidade celular. Legenda: $\bar{x}ABS_{tratado}$= média da absorvância do grupo tratado; $\bar{x}ABS_{branco}$: média da absorvância do branco; $\bar{x}ABS_{controle\ negativo}$:média da absorvância do controle negativo.

Após o cálculo da viabilidade celular, as concentrações citotóxicas (CC) de 20%, 50% e 80% foram determinadas através de regressão sigmoidal usando dados da média de três poços para cada replicata, sendo o ensaio realizado em três

replicatas em dias e idades celulares (passagens) diferentes, através do *software* "OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.4.2 Avaliação da toxicidade aguda dose única *in vivo* – 14 dias e avaliação da toxicidade sub-crônica doses repetidas *in vivo* – 90 dias

A avaliação da toxicidade aguda e subcrônica foi realizada conforme descrito no *Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure* (OECD, 2001), e *Guideline for testing of chemicals. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents* (OECD, 1998) e desenvolvido seguindo normas de cuidados com animais de laboratório, bem estar e biossegurança na experimentação animal descritas na Lei Arouca, Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), e segundo as diretrizes pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2010).

Os animais machos e fêmeas (n=5) foram mantidos em jejum de oito horas. Após esse período administraram-se as doses de 2000 mg/kg da oleorresina, dos extratos e ácido poliáltico das *C. oblongifolia* e *C. duckei* para o teste agudo. Após esta etapa de *screening*, o teste foi repetido com a dose de 1000 mg/kg de oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei.* Para o experimento de toxicidade subcrônica foram administradas doses diárias de 1, 10 e 100 mg/kg da oleorresina de *C. duckei.* Nos grupos controle negativo foram administrados o veículo (cremofor 5%, 0,1 mg/kg). Após a administração, observaram-se os animais individualmente, nos períodos de 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h, e, a partir de então, periodicamente ao dia, até o 14° dia, para o teste agudo e até o 90° dia, para o estudo subcrônico. A cada dia, os animais foram monitorados quanto ao peso e consumo de ração e água.

As observações das alterações comportamentais sistemáticas foram realizadas de acordo com o "*screening*" hipocrático: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte (MALONE; ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1977).

No dia final dos experimentos, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (solução na dose de 10 e 100 mL/kg, de cada anestésico respectivamente) para a coleta do sangue através de punção cardíaca e posterior análise hematológica e bioquímica. Em seguida, foi realizada a autópsia para análise macroscópica dos órgãos, sendo observados o tamanho, posição, forma, e cor dos órgãos internos em busca de alterações em sua integridade. As análises hematológicas e bioquímicas foram feitas no laboratório de Serviço de Análises Clínicas (SAC) da FCFRP-USPP. Para as análises hematológicas utilizou-se analisador de multi-parâmetros hematológico automatizado Cell Dyn 3700SL (Abbott, Chicago, IL, EUA), operado pela farmacêutica Dra. Claudia Helena Perone e pela biomédica Dra. Ana Paula Zueli Barião, obtendo-se os seguintes parâmetros: número total de hemácias (RBC) hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), Red cell distribution (RDW), número total de leucócitos (WBC), neutrófilos (NEU), linfócitos (LIN), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS), basófilos (BASO), número total de plaquetas (PLT) e volume plaquetário médio (VPM).

Para as análises bioquímicas utilizou-se auto-analisador bioquímico de acesso randômico CT 600i (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), operado pela farmacêutica Dra. Luisa Helena Dias Costa e pela biomédica Dra. Luciana Prado Turim do Nascimento. Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total, triglicerídeos, creatinina, uréia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamiltransferase (gamma-GT).

Os órgãos foram pesados e os que apresentaram alterações quanto à forma, coloração e peso foram preservados em formalina tamponada para a preparação de cortes histológicos. As amostras foram submetidas à técnica histológica clássica, sendo os blocos cortados em 4 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada, onde foi coletado todo o corte múltiplo de 10. As lâminas cortadas foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Todos os procedimentos histológicos foram terceirizados e realizados no Laboratório Histocell (São Paulo – SP), sob responsabilidade técnica do biólogo Leandro Pereira Braga.

4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora

4.5.1 Avaliação da atividade gastroprotetora *in vitro*

a) Citotoxidade em linhagem celular imortalizada AGS

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 5 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. Após vinte e quatro horas, as células foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* nas concentrações de 3, 10, 300, 100 e 300 µg/poço, ácido gálico, ácido quínico e 16 ácidos galoilquínicos nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10 e 30 µg/poço e os controles positivos com as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 nM/poço, celecoxib e indometacina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h, 72h e 120h. Após os tempos de incubação, as placas foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do teste por fosfatase ácida (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993). As placas foram lavadas com 100 µL de PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 h a 37 ºC, 5% de CO_2 com uma solução de 4-nitrofenil dissódico hexa-hidrato de fosfato, na concentração de 0,0027 g/mL em 0,1 M de acetato de sódio, 0,1% de Triton X-1 00, pH 5,5. Após a etapa de incubação adicionou-se 50 µL de NaOH a 1 M para interromper a reação. A absorvância foi determinada em leitor de microplacas a 405 nm EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrom, Cambourne, CBE, UK).

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a **Equação 2**.

Após o cálculo da viabilidade celular, as concentrações citotóxicas (CC) de 20%, 50% e 80% foram determinadas através de regressão sigmoidal usando dados da média de três poços para cada replicata, sendo o ensaio realizado em três replicatas em dias e idades celulares (passagens) diferentes, através do *software* “OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)”, versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

b) Determinação de morte celular por iodeto de propídio em linhagem celular imortalizada AGS

Alíquotas de 600 µL/poço da suspensão celular contendo 50 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 24 poços. Após vinte e quatro horas, as células

foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* ou *C. duckei* nas concentrações de 30 e 100 µg/poço, os controles positivos com as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 10 e 50 nM/poço. Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h, 72h e 120h.

A morte celular foi determinada por iodeto de propídio em citometria de fluxo (BD Accuri C6 BD Biosciences, East Rutherford, NJ, EUA) (PICK et al., 2004), utilizando-se os *software* "BD Accuri™ C6 Software para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 1.0.264.21, 2011 (Franklin Lakes, NJ, EUA), e o software "FlowJo® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão X10.0.7r2, 2013 (San Carlos, CA, EUA), sendo expressa por percentual de células vivas e mortas.

c) Scratch wound em linhagem celular imortalizada L929

Alíquotas de 600 µL/poço da suspensão celular contendo 50 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 24 poços. Após vinte e quatro horas, com o auxílio de uma ponteira 0-200 µL foi realizado o *scratch* na placa, ou seja, foram feitos "rasgos" na monocamada de células de acordo a **Figura 3** (VEDULA et al., 2013; YARROW et al., 2004):

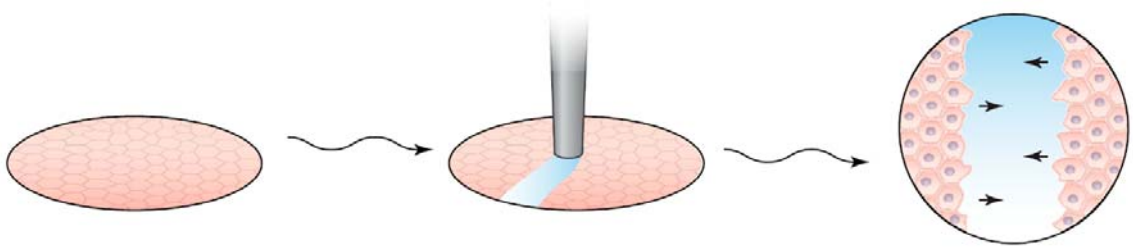


Figura 3. Representação esquemática do experimento de Scratch wound para o estudo do comportamento da migração celular.
Fonte: adaptado de VEDULA et al. (2013)

Após este procedimento, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline* - PBS) para remoção das células deslocadas. O meio foi substituído e as células foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* ou *C. duckei* nas concentrações de 30 e 100 µg/poço. Em microscópio de inversão (Leica DM IL Inverted Microscope, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA), acoplado a câmera foram obtidas imagens nos tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48h após o *scratch*. Com o uso do *cc* onde foram medidas as distâncias (µm). Os

resultados foram analisados pelo *software* “GraphPad Prism® para sistema operacional Windows (64 bits), versão 5.0, 2007 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), e expressos em porcentagem de migração.

É importante ressaltar que antes do plaqueamento das células, foi realizada uma marcação central no fundo da placa utilizando um marcador permanente com o objetivo de padronizar o local do *scratch* e o local da obtenção das imagens, com finalidade de diminuir o erro.

4.5.2 Avaliação da atividade gastroproterora sob úlceras agudas

a) Modelos de úlceras agudas induzidas por etanol/HCl

Este modelo é um dos mais utilizados no *screening* para investigação da atividade gastroprotetora (MIZUI; DOTEUCHI, 1983). Os animais (n=6) foram pré-tratados por v.o. com omeprazol 30 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia* (30, 100 e 300 mg/kg), oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma solução contento EtOH/HCl 0,03 M (0,1 mL/10 g de peso do animal, v.o.) e, uma hora após a administração do agente lesivo, os mesmos foram sacrificados por deslocamento cervical. Para a análise estatística, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da curvatura maior, sendo histologicamente preparados entre placas de vidro para a obtenção das imagens digitalizadas. As imagens obtidas foram analisadas pelo *software* “ImageJ® para sistema operacional Windows (64 bits)”, versão 1.50i (2016) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004; RASBAND, 2016; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), a fim de determinar a área total de lesão em mm^2 e porcentagem de área lesada. O índice de cura foi calculado em relação à área de lesão através da **Equação 2**:

$$IC = 100 - \left(\frac{\%AL_{tratado} \times 100}{\bar{x}\%AL_{controle}}\right)$$

Equação 2. Fórmula para determinação do índice de cura. Legenda: $\%AL_{tratado}$: Porcentagem de área lesada do grupo tratado; $\bar{x}\%AL_{controle}$: Média da porcentagem de área lesada do grupo controle

Também foram testadas no modelo de úlceras por EtOH/HCl as frações do extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na dose 100 mg/kg, e os compostos isolados ácido ent-agático, ácido caurenoico, ácido poliáltico, afzelina, α-humuleno, β-cariofileno, canferol, óxido de cariofileno, quercetina, quercitrina, ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico, ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico, ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico, ácido 5'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico, ácido 5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico, ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico, e ácido 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, na dose de 30 mg/kg.

b) Modelos de úlceras agudas induzidas por AINEs (indometacina)

O método utilizado foi primeiramente descrito por Rainsford e Whitehouse (1980), com algumas modificações. Os animais (n=6) foram pré-tratados por v.o. com ranitidina 100 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia* (30, 100 e 300 mg/kg), oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma solução de indometacina 100mg/kg de peso do animal por v.o., preparada em solução carbonato de sódio a 5%, em pH 7,4, e 12 horas após a administração do agente lesivo, os mesmos foram mortos por deslocamento cervical. Os estômagos foram processados para a obtenção da imagem e as análises foram realizadas conforme descrito no item anterior, **4.5.2, subitem a**.

4.5.3 Avaliação da atividade gastroproterora sob úlceras crônicas

a) Modelos de úlceras crônicas induzidas por ácido acético

Antes da indução da úlcera, os camundongos passaram por um período de adaptação contra o estresse causado pela sua manipulação e administração dos tratamentos. Submeteu-se os animais à restrição alimentar por 1 hora diária (16:00 às 17:00), sendo a água mantida *ad libitum*. Após esse período, foi administrado aos animais 0,1 mL/10 g (peso de animal) de água destilada durante três dias. Após a

adaptação, os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 h, para posterior procedimento cirúrgico. Estes, foram anestesiados com uma mistura anestésica de xilazina e cetamina (10 mg e 100 mg/kg de peso animal) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifóide. Após a exposição do estômago, foi injetado na camada subserosa da parede externa do estômago 20 µL de solução de ácido acético 20%. Um grupo normal foi injetado 20 µL de salina (naïve). O local foi pressionado por 30 segundos para evitar o extravasamento do líquido injetado e lavado delicadamente com salina, para evitar aderência aos demais órgãos, sendo a parede abdominal posteriormente suturada (TAKAGI; OKABE; SAZIKI, 1969). O antiséptico iodopovidina foi aplicado no local da sutura para melhorar o processo de cicatrização. Dois dias após de recuperação dos animais, iniciou-se o tratamento, no qual os animais operados com a administração do ácido acético e foram divididos em diferentes grupos (n=6), classificados de acordo com o seu tratamento ranitidina 100 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*; oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei* (300 mg/kg).

Aos animais falso-operados (controle normal, n=6) foi administrado salina. Diariamente, os animais foram pesados para a determinação da dose administrada por via oral. Ao final do período de tratamento (7 dias), os animais foram mortos, e os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura e esticados. As imagens foram digitalizadas e analisadas por *software* ImageJ®, para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 1.50i (2016) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004; RASBAND, 2016; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), a fim de determinar-se se houve regressão da lesão nos tratamentos quando comparados com o controle, sendo realizada a determinação da quantidade total de área lesada (mm^2), quantidade relativa de área lesada (%), e índice de cura (IC %), calculado de acordo com a **Equação 4**:

$$IC = 100 - \left(\frac{\%AL_{tratado} \times 100}{\bar{x}\%AL_{controle}}\right)$$

Equação 3. Fórmula para determinação do índice de cura. Legenda: $\%AL_{tratado}$: Porcentagem de área lesada do grupo tratado; $\bar{x}\%AL_{controle}$: Média da porcentagem de área lesada do grupo controle

Além de analisar as úlceras crônicas de forma macroscópica foram analisados os aspectos histológicos envolvidos. As amostras foram submetidas à técnica histológica clássica, onde os blocos foram cortados em 4 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada, onde foi coletado todo o corte múltiplo de 10. As lâminas cortadas foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A análise morfométrica foi determinada através do método descrito por Ishihara e Ito (2002) com algumas modificações. A média em 10 campos diferentes da distância entre a camada submuscular da mucosa até o lúmen do estômago foi determinada em microscópico óptico e em *software* ImageJ®, para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 1.50i (2016) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004; RASBAND, 2016; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), para a análise das imagens. Durante a determinação da distância, cada corte recebeu uma classificação, baseada nos critérios de análise histológica, realizada de acordo com o método descrito por Dokmeci et al. (2005) onde:

0: mucosa normal;
1: dano em célula epitelial;
2: rompimento glandular, vasoconstrição ou edema em mucosa superior;
3: rompimento de mucosa, vasoconstrição ou edema em mucosa mediana;
4: dano na mucosa extenso, vasoconstrição ou edema em toda a mucosa.

A moda (o valor de maior repetição) para cada grupo foi considerada como o índice de úlcera histológico. Todos os procedimentos histológicos foram terceirizados e realizados no Laboratório Histocell (São Paulo – SP), sob responsabilidade técnica do biólogo Leandro Pereira Braga.

4.5.4 Avaliação da atividade sobre a secreção gástrica

a) Modelo de avaliação da secreção gástrica e doseamento de muco gástrico (ligadura de piloro)

Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 h, e após esse período, foram anestesiados com uma mistura anestésica de xilazina e cetamina (10 mg e 100

mg/kg de peso animal) e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifoide (SHAY et al., 1945; SUN; MATSUMOTO; YAMADA, 1991). Após a exposição do estômago, a válvula pilórica foi amarrada, e por via intraduodenal foram administrados os seguintes tratamentos ranitidina 100 mg/kg (controle positivo), carbenoxolona 200 mg/kg (controle negativo), indometacina 100 mg/kg (controle negativo), veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina de *C. oblongifolia* e extrato das folhas de *C. oblongifolia* (30, 100 e 300 mg/kg), e oleorresina de e extrato das folhas de *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg).

Depois dos tratamentos, as incisões foram suturadas, e quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos por deslocamento cervical. As incisões foram reabertas e após o pinçamento da válvula cárdia (para evitar a perda do conteúdo gástrico), o estômago foi retirado para determinação do conteúdo estomacal, pH, concentração de íons hidrogênio e quantidade de muco aderido a mucosa.

Após a determinação do volume, foram adicionados 5 mL de água destilada à amostra, sendo posteriormente centrifugada por 10 min a 3000 rpm. No sobrenadante, foi determinado o pH através de pHmetro (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) e titulado com solução de hidróxido de sódio a 0,01 N, para a determinação da acidez titulável, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em mL (volume), pH e mEq/L/4h (concentração de íons hidrogênio).

Ao tecido estomacal foram adicionados 7 mL de solução de Alcian Blue (Alcian Blue 0,02%, sacarose 0,16 M, acetato de sódio 0,05 M; pH 5,8 a 20 ºC) por 24 horas. Após este período, o tecido estomacal foi retirado, e o sobrenadante centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada através de espectofotometria em 630 nm, em triplicata. As leituras foram interpoladas em equação da curva padrão de solução de Alcian Blue (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL), sendo os resultados calculados sobre a média das leituras. Os resultados foram expressos em quantidade de corante aderido ao muco (mg) por grama de tecido (g).

4.5.5 Atividade anti-*Helicobacter pylori*

a) Preparo do inóculo

A suspensão bacteriana de *Helicobacter pylori* (ATCC® 43504) foi doada pela Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ, através do Prof. Dr. Domingos Tabajara da Universidade Federal do Mato Grosso. A cultura bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 72h/10% CO_2 em TSA suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A suspensão bacteriana foi feita utilizando-se salina (NaCl 0,9%) até obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland (contendo aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL). Verificou-se em leitura espectrofotométrica (625 nm) para confirmação da concentração de micro-organismos (ABS = 0,100 a 0,110). Em 9 mL de salina foi adicionado 1 mL da solução anterior (1,5 x 10^7 UFC/mL). Após agitação, retirou-se 2 mL e misturar com 10 mL de TSB suplementado com 10% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 2,5 x 10^6 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

b) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A7 do *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (CLSI, 2006a) para as bactérias aeróbicas e o seu suplemento M100-S16 (CLSI, 2006b), para as bactérias fastidiosas, com modificações.

Os poços das microplacas foram preenchidos com 100 µL de TSB suplementado a 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, foram acrescentados 100 µL das soluções das oleorresinas, dos extratos e frações das *Copaifera* spp. e realizada a diluição seriada de 400 a 0,195 µg/mL. A cada poço adicionaram-se 80 µL de TSB suplementado a 10% de SFB para ajustar o volume. Adicionaram-se 20 µL da suspensão da bactéria na concentração de 2,5 x 10^6 UFC/mL, obtendo-se uma concentração final de 2,5 x 10^5 UFC/mL (2,5 x 10^5 UFC por poço). O antibiótico padrão utilizado foi a claritromicina na concentração inicial de 5 µg/mL até 0,0195 µg/mL. Como controles realizados foram o controle de esterilidade dos extratos vegetais, o

controle do meio de cultura (CC), o controle de crescimento bacteriano (CB), e o controle do solvente (DMSO).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37ºC em por 72 horas sob condição de microaerofilia. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas de 2 µL de cada poço e semeadas em placas de cultura contendo meio TSA suplementado com 5% de sangue de carneiro para determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

Para avaliar a atividade anti-*H. pylori* foram considerados como CIM a menor concentração da oleorresina, dos extratos e frações capazes de inibir visualmente o crescimento bacteriano, sendo de alta atividade as CIMs menores que 64 µg, com moderada atividade as CIMs com faixa de 65 a 500 µg, com pouca atividade as CIMs de 500 a 1000 µg e sem atividade os extratos com CIMs maiores que 1000 µg (HACHEM et al., 1996). Foram consideradas como CBM as menores concentrações capazes de inibir definitivamente o crescimento bacteriano após incubação nas placas de cultura contendo meio TSA suplementado com 5% de sangue de carneiro.

c) Revelação do CIM com resazurina

Após 72 horas de incubação as placas foram retiradas da estufa, e adicionaram-se 20 µL da solução de resazurina na concentração de 0,02%. Foram considerados positivos os poços que apresentaram mudança de coloração de azul para rosa, indicando assim a presença de crescimento bacteriano. A menor concentração onde não se observou a mudança de coloração foi considerada como a concentração para CIM.

d) Modelos de úlceras crônicas induzidas por ácido acético com co-infecção por Helicobacter pylori

Os animais foram submetidos à indução de úlceras crônicas por ácido acético conforme descrito no **item 4.5.3, subitem a**. Após dois dias de recuperação dos animais, a infecção dos animais administrando-se a bactéria *Helicobacter pylori* (ATCC® 43504) (KONTUREK et al., 1999; SOUZA et al., 2009). A *H. pylori* (1 mL na concentração de 9×10^8 UFC/mL, em caldo TSB suplementado com 10% de SFB) foi administrada pela manhã e os tratamentos no final da tarde, a saber: claritromicina (25mg/kg) + amoxicilina (50 mg/kg) + omeprazol (20 mg/kg) (controle positivo), veículo

(controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina de *C. oblongifolia* (300 mg/kg) e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg). Para a confirmação da infecção bacteriana no animal foi utilizado o teste de urease, Uretest® (RenyLab®, Barbacena, MG, BRA) (MAZZOLENI et al., 2011), no qual, em presença da bactéria, o reagente de coloração amarela torna-se rosa. Além disso, os estômagos foram digitalizados para a análise macroscópica da lesão, conforme descrito no **item 4.5.3, subitem a**.

4.5.6 Mecanismos de ação gastroprotetora antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante será avaliada por diferentes métodos que simulam a formação de ROS. A atividade antioxidante será expressa pela porcentagem de inibição *versus* a concentração da amostra no meio reacional, sendo a porcentagem de inibição determinada pela **Equação 4**:

$$\%I = 100 - \frac{A_{amostra} \times 100}{A_{controle\ positivo}}$$

Equação 4. Fórmula para determinação da porcentagem de inibição da atividade antioxidante. Legenda: $A_{amostra}$: Absorvância da amostra, nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) da amostra nos métodos quimioluminescentes; $A_{controle\ positivo}$: Absorvância do controle positivo nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) do controle positivo nos métodos quimioluminescentes

Desta forma foi possível obter uma curva dose-resposta, assim como estimar a concentração efetiva inibe o processo oxidativo em 50% (EC_{50}) utilizando uma curva hiperbólica. A determinação do CE_{50} é um parâmetro muito utilizado para medir a atividade antioxidante (PAREJO et al., 2000) sendo que quanto menor o CE_{50} maior é a atividade antioxidante.

a) Determinação da atividade doadora de $H^{\bullet}$ ao radical $DPPH^{\bullet}$

A atividade antioxidante foi avaliada pela diminuição da absorvância da solução metanólica do radical $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O método do $DPPH^{\bullet}$ é baseado na redução do radical $DPPH^{\bullet}$ a DPPH-H que leva a alteração colorimétrica (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Moléculas doadoras de íons hidrogênio ($H^{\bullet}$), como por exemplo, os polifenóis são capazes de diminuir a

absorvância das amostras (BLOIS, 1958). Preparou-se uma solução de DPPH• na concentração de 0,06 mM. A curva de DPPH• (60 µM) foi realizada nas concentrações de 10 a 50 µM, em espectrofotômetro a 515 nm. O metanol foi utilizado como branco. As leituras foram realizadas em triplicata e os dados plotados em DPPH• (µM) x ABS, com equação da curva para cálculo da CE_{50}.

Dissolveram-se as amostras na concentração de 1 a 2 mg/mL para a realização da curva para as amostras (5 pontos, ajustadas de acordo com cada amostra). Em tubos de ensaio, adicionaram-se 50 µL da amostra e 500 µL de solução metanólica de DPPH• (60 µM). Aguardaram-se 30 min para a reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 515 nm, em triplicata. A variação da absorvância, proporcionada pelas amostras, foi comparada à absorvância do controle positivo (apenas DPPH•), que corresponde à absorvância máxima (100%).

b) Determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimioluminescência com oxidação do luminol

Este ensaio baseia-se na medição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina oxidase (XOD)/luminol. Nesse sistema, a enzima xantina oxidase (XOD), na presença de oxigênio, reage com seu substrato xantina, produzindo ácido úrico e o radical superóxido, que oxida o luminol, que se rearranja passando para seu estado de excitação (SANTOS; SANTOS, 1993). A luz emitida pelo luminol, ao voltar para seu estado basal, é detectada pelo luminômetro, e a quantidade de luz emitida pelo luminol é proporcional à quantidade de ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase. Substâncias que possuem a capacidade de sequestrar os radicais superóxidos formados provocam a diminuição da luminescência, tornando possível a quantificação de tais substâncias antioxidantes por esse sistema.

As amostras foram preparadas na concentração de 1 a 2 mg/mL (5 pontos, ajustadas de acordo com cada amostra). Em tubos de ensaio, pipetaram-se 400 µL de tampão glicina, 150 µL de xantina, 10 µL da amostra, 10 µL de luminol e 100 µL de xatina oxidase. Agitou-se rapidamente e realizou-se a leitura no luminômetro AutoLumat® LB 953 Multi-Tube Luminometer (Berthold Technologies Measurement Systems, Oak Ridge, TN, USA). O tampão glicina foi utilizado como branco e as leituras foram realizadas em triplicata.

c) Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em gema de ovo

O ensaio para a avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro* foi realizado através da determinação do conteúdo de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando a gema de ovo como substrato lipídico (COSTA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; HAZZIT et al., 2009; SILVA et al., 2007).

A medida da inibição da peroxidação lipídica foi determinada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica. O MDA é um aldeído que reage com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre 90 e 100ºC (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

As amostras foram dissolvidas em solução de Pluronic 2% na concentração de 1,0 mg/mL, sendo que a partir destas soluções foram preparadas cinco diluições para cada amostra avaliada. O substrato homogenato de gema de ovo (10% p/v) foi preparado em solução de tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Para a indução da peroxidação lipídica, adicionou 1,0 mL do homogenato de gema de ovo, 100 µL das amostras nas diferentes concentrações e 100 µL de solução de sulfato de ferro (II) 0,07 M em microtubos, os quais foram mantidos em estufa a 37ºC por 30 minutos. Um controle branco foi preparado da mesma forma, apenas adicionando-se o solvente no lugar da amostra. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Após o período de 30 minutos, os microtubos foram resfriados até temperatura ambiente e uma alíquota de 500 µL de cada amostra foi transferida para microtubos contendo 1,0 mL de uma solução de ácido tricloroacético 15% em HCl 0,25 M. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação uma alíquota de 500 µL do sobrenadante de cada microtubo foi transferida para tubos de ensaio contendo 500 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% em HCl 0,1 M. Os tubos de ensaio foram então levados para aquecimento em banho-maria a 95ºC por 30 minutos. Ao final dos 30 minutos os tubos foram retirados para resfriarem até atingirem temperatura ambiente e a absorvância de cada tubo foi determinada através de espectrofotômetro, em comprimento de onda de 532 nm.

A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica foi determinada comparando-se as absorvâncias das amostras com o controle através da **Equação 5**:

$$I = \left[\left(\frac{1 - A_1}{A_0}\right) \times 100\right] - 100$$

Equação 5. Fórmula para cálculo da porcentagem da inibição da peroxidação lipídica. Legenda: A_0= absorvância do branco (controle); A_1: absorvância da amostra.

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva da amostra necessária para reduzir em 50% a peroxidação lipídica) para cada amostra foram determinados pela equação da reta obtida através da regressão linear entre os valores das concentrações finais de cada amostra testada (nas diferentes diluições) e as porcentagens de inibição de peroxidação lipídica para cada uma dessas concentrações, através do *software* "OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)", 2013, versão 9.1 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.5.7 Inibição da óxido nítrico sintase (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) *in vivo*

Os animais foram divididos em três grandes grupos (n=18), sendo que 6 animais de cada grupo foram pré-tratados, via i.p. com salina (0,1 mL/kg), L-NAME (70 mg/kg) (ARRIETA et al., 2003) e NEM (10 mg/kg) (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999). Após 30 min, os grupos foram divididos (n=6) novamente em pré-tratados por v.o. com carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina de *C. oblongifolia* (300 mg/kg), extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg), oleorresina de *C. duckei* (300 mg/kg) e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. duckei* (300 mg/kg). Após 60 min dos tratamentos, prosseguiu-se com o experimento de úlceras agudas induzidas por EtOH/HCl, conforme descrito no **item 4.5.2, subitem a**.

4.5.8 Determinação da atividade da glutationa S-Transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e óxido nítrico (NO) na região glandular gástrica

Os animais foram divididos (n=6) e pré-tratados por v.o. com N-acetilcisteína 750 mg/kg (controle positivo); carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), naïve (salina) oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg), oleorresina e extrato

hidroalcoólico das folhas de *C. duckei* (300 mg/kg). Após 60 min dos tratamentos, prosseguiu-se com o experimento de úlceras agudas induzidas por EtOH/HCl, conforme descrito no **item 4.5.2, subitem a**. A região glandular gástrica foi seccionada e separada em dois pedaços, pesados e preparados os homogenatos em EDTA (0,02 M) gelado e tampão PBS (NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 81 mM e KH_2PO_4 15 mM) gelado em Turrax TE-120 a 21500 rpm por 2 minutos e centrifugados a 10000 rpm/ 4 °C por 10 min. A princípio, foram dosadas as proteínas totais nas amostras para cálculo com as demais dosagens (LOWRY et al., 1951).

a) Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método espectrofotométrico de redução do citocromo C. Foram utilizados os homogenatos em tampão PBS previamente diluídos 1:20. Em uma cubeta de quartzo, adicionou-se 1,45 mL do reagente de trabalho, composto de tampão fosfato-EDTA (50 mM-0,1 mM, pH 7,8) em solução de NaOH (1 mM), xantina (5 µmol/mL) e citocromo C (2 µmol/mL). A essa solução foram adicionados 25 µL do homogenato e 2 µL de xantina oxidase (50 mg ptn/mL), que iniciou a reação. Em seguida, a reação foi monitorada a cada 60 segundos em espectrofotômetro a 550 nm, durante 10 minutos. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de SOD suficiente para inibir a taxa de redução do citocromo C em 50%, e a atividade da enzima foi expressa em unidades/min/mg de proteína. O branco foi preparado com PBS e o padrão SOD (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

b) Determinação de grupamentos sulfidrílicos não-proteicos (GSH)

Foram utilizados os homogenatos preparados com EDTA 0,02 M gelado. Realizou-se a leitura do branco da amostra, fazendo-se a leitura da absorvância de 100 µL da amostra, acrescidos de 100 µL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A_1). Após esta leitura, adicionaram-se 20 µL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e realizou-se uma nova leitura (A_2), a 412 nm, em 15 minutos de reação, para determinação de grupamentos sulfidríla não protéico (GSH). A concentração de grupamento sulfidríla (tiol) é dada por (A_1 – A_2) x 1,57, em curva padrão de glutationa. A concentração de GSH foi calculada como nmol GSH/g de tecido (FAURE; LAFOND, 1995).

c) Determinação da atividade de catalase (CAT)

Foram utilizados os homogenatos em tampão PBS previamente diluídos 1:20. Pipetaram-se 2 mL de solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em cubeta de quartzo. Adicionaram-se 20 µL da amostra. Em espectrofotômetro foi realizada a leitura do decaimento a cada 60 segundos durante 10 min. A atividade da catalase foi calculada como µmol H_2O_2 consumido/min/mg de proteína. Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína. Cada U de catalase corresponde a atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1 µmol de H_2O_2 por min a 25 °C em pH 8 (AEBI, 1984).

d) Determinação de óxido nítrico (NO)

A concentração de óxido nítrico nos homogenatos em tampão PBS foi analisada quanto à produção de nitrito pela reação de Griess (GREEN et al., 1982; GRIESS, 1879), uma medida indireta da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982). Em placa de 96 poços pipetaram-se 50 uL das amostras. Adicionou-se igual volume do reagente de Griess, composto de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5% e diidrocloreto de naftilenodiamina 0,1%. Incubou-se de 10 a 15 min em temperatura ambiente. A absorvância do cromóforo formado durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletilenodiamino foi medido por espectrofotometria a 546 nm. Os dados foram expressos em curva-padrão com diferentes concentrações de nitrito de sódio. A concentração de NO foi calculada como µM de nitrito/g de tecido.

4.5.9 Mecanismos de ação gastroprotetora anti-inflamatória

a) Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) na Região Glandular Gástrica

A atividade enzimática da MPO foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação. Sendo que 1 U de mieloperoxidase determinada é capaz de degradar 1 mmol/min de água oxigenada a 25 °C. Foram utilizados os homogenatos em tampão PBS previamente diluídos 1:20. Em microplaca de 96 poços foram aliquotados 60 µL das amostras, adicionando-se 200 µL de tampão fosfato contendo 0,167 mg/mL de *O*-dianisidina e 0,015% de

peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudanças na absorvância a 450 nm foram medidas no tempo 0 e 5 min. A atividade da enzima nas amostras foi determinada através de uma curva padrão de mieloperoxidase. Os resultados foram expressos em unidade de mieloperoxidase por miligrama de tecido (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984).

4.5.10 Mecanismos de ação gastroprotetora anti-secretória

a) Determinação da atividade sobre a enzima H^+, K^+-ATPase

Para o isolamento e verificação da atividade da foi utilizado o estômago de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) albino. O animal foi sacrificado através de concussão cerebral. O estômago foi removido, colocado imediatamente em banho de gelo, aberto pela curvatura maior, lavado, sendo que as regiões do antro e do fundo foram descartadas. Realizou-se a separação da mucosa da região glandular e procedeu-se o isolamento dos microssomos gástricos através da homogeneização do tecido da mucosa em tampão de homogeneização: Tris.HCl 50 mM (pH 7,4) contendo sacarose 250 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidores de protease 0,01%, utilizando-se 5 volumes de tampão/g de tecido. O homogenato foi centrifugado a 5000 rpm durante 20 minutos, o precipitado descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 30.000 rpm durante 1 hora. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura de 4 °C. A purificação da H^+, K^+-ATPase foi realizada por centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose. O precipitado obtido da centrifugação de 30000 rpm contendo as vesículas com H^+, K^+-ATPase foi ressuspendido em 3 mL de sacarose 250 mM, cuidadosamente transferido para um tubo com sacarose 30% e centrifugado novamente a 30000 rpm por 1 hora. Duas bandas pequenas e um precipitado foram obtidos. As membranas sedimentadas na superfície da solução de sacarose 30% foram coletadas obtendo-se os microssomos purificados contendo a enzima H^+, K^+-ATPase gástrica (KUBO et al., 1995).

O material enzimático foi, então, congelado e guardado a -70 °C até ser utilizado. O conteúdo de proteína presente na amostra foi determinado em placa de 96 poços com o reagente de Bradford, utilizando uma curva padrão de albumina (0,0625-1 mg/ml). Na fase de caracterização da H^+, K^+-ATPase, realizou-se o bloqueio específico da bomba de prótons pelo inibidor omeprazol (345 µg/mL), e a fim de

descartar a presença de Na^+, K^+-ATPase utilizou-se a ouabaína (728 µg/mL) (inibidor específico de Na^+, K^+-ATPase).

A atividade ATPásica foi determinada mediante quantificação do fósforo inorgânico (Pi) liberado da hidrólise de ATP exógeno pela enzima na presença de K^+. A reação foi iniciada pela adição de 37,5 µg de proteína enzimática a 500 µL de tampão Tris/HCl (pH 7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5 mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP 1 mM, na ausência e na presença das drogas a serem testadas. A reação foi encerrada após 20 minutos de incubação a 37 °C pela adição de 50 µL de ATC 50% e esfriamento rápido em banho de gelo (MURAKAMI et al., 1992). O fosfato inorgânico produzido foi determinado através da adição às amostras de 1,5 mL da solução reagente contendo de água (4,7 mL), ácido sulfúrico 10 N (0,7 mL), molibdato de amônio 2,4% (0,6 mL) e ácido ascórbico 10% (3 ml). As amostras foram incubadas por 20 minutos em banho-maria a 37 °C e a leitura da placa realizada em espectrofotômetro a 820 nm. O reagente foi preparado no momento do uso (FISKE; SUBBAROW, 1925; NADER; TERSARIOL; DIETRICH, 1989).

A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção do Pi (ε = 11000/M/cm), e expressos em uM Pi/mg de proteína/min. Para se verificar a ação das oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* sobre o funcionamento da enzima foram utilizadas as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, sendo que todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.6.1 Avaliação da atividade sob o sistema nervoso central

a) Atividade locomotora (Campo aberto – Open field)

Para verificação dos efeitos da oleorresina e extrato bruto das folhas das espécies de *Copaifera* spp. sobre a atividade motora dos animais, será utilizado o modelo de *Open Field*, de acordo com o modelo de Hall e Ballachey (1932), com algumas modificações. Este teste verifica se as amostras interferem na função motora dos animais, ou seja, se há efeitos sobre o sistema nervoso do animal, causando a ausência de resposta aos estímulos e resultando em um falso-positivo para a atividade antinociceptivas . Os animais (n=5) foram pré-tratados por i.p. com diazepam 1 mg/kg

(controle positivo), v.o., veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg), oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei* (300 mg/kg), e ácido poliáltico (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos (com exceção do diazepam, administrada 30 min antes ao experimento), os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O campo aberto consiste em uma caixa, com 60 cm de diâmetro e borda de 50 cm de altura, com a parte inferior dividida em nove quadrantes de área igual. O número de cruzamentos realizados com as quatro patas entre as divisões (*crossings*) e da atividade exploratória vertical (*rearings*) foi quantificado durante uma sessão de 5 min.

b) Coordenação motora (Rota-Rod)

Para verificação dos efeitos da oleorresina e extrato bruto das folhas das espécies de *Copaifera* spp. sobre a coordenação motora dos animais, será utilizado o modelo de *Rota Rod* de acordo com Jones e Roberts (1968), com algumas modificações. Este teste verifica, de maneira complementar ao campo aberto, se as amostras interferem na função motora dos animais, ou seja, se há efeitos sobre o sistema nervoso do animal, causando a ausência de resposta aos estímulos, podendo resultar em um falso-positivo para a atividade antinociceptiva. Vinte e quatro horas anteriores ao experimento, os animais foram treinados e somente os que ficavam sobre a barra giratória por um período superior a 1 min durante dois períodos consecutivos foram selecionados para o experimento. No dia do experimento, os animais (n=5) foram pré-tratados por i.p. com diazepam 1 mg/kg (controle positivo), v.o., veículo (controle negativo, solução de Cremofor 10%), oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg), oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei* (300 mg/kg), e ácido poliáltico (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos (com exceção do diazepam, administrada 30 min antes ao experimento), os animais foram submetidos ao teste do *Rota Rod*. O aparelho de *Rota Rod* é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 rpm. Os animais foram colocados na barra por 1 minuto, sendo registrado o tempo de permanência (em segundos).

4.6.2 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

a) Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O método de contorções abdominais induzido por ácido acético foi utilizado para *screening* da atividade analgésica (COLLIER et al., 1968; KOSTER; ANDERSON; DEBEER, 1959). Os animais foram divididos em grupos (n=6) e pré-tratados com dexametasona 0,5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam a injeção intra-plantar (i.pl.) de ácido acético a 0,1 N (0,1 mL/10 g do animal). As respostas contorsivas (contorções no abdômen e extensão das patas traseiras) foram quantificadas durante 20 min. e consideradas como índice de nocicepção.

4.6.3 Modelos de nocicepção aguda

a) Modelo de nocicepção espontânea produzida por formalina

O método de nocicepção espontânea induzida por formalina é amplamente utilizado para *screening* da atividade analgésica e anti-inflamatória (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=6), e pré-tratados com morfina 5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam uma injeção i.pl. de formalina 2,5% (20 µL/pata). Imediatamente após a administração da formalina, o tempo em que o animal lambe a pata injetada foi cronometrado em duas fases (0-5´; 1ª fase; dor neurogênica); (15-30´; 2ª fase; dor inflamatória), sendo considerado tempo zero o momento imediatamente após a administração da formalina.

b) Modelo de nocicepção térmica através do teste de retirada da cauda (Tail-Flick)

Para avaliar o tempo de reação ao calor, foi utilizada uma fonte radiante de calor que emite somente em um ponto a 55 °C (D'AMOUR; SMITH, 1941). Primeiramente, os animais foram avaliados para determinar o limiar térmico basal (B)

e o tempo de latência a reação do calor. Estes dados serviram de parâmetro de tempo(s) que cada animal levou para retirar a cauda (tempo de latência) sendo este cronometrado. Os animais foram selecionados 24h antes do experimento e os que possuíam resposta curta e rápida ao estímulo doloroso foram selecionados para o teste (acima de 1'30'' min e menor que 5' min). Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=6), e pré-tratados com morfina 5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg).

A fim de investigar os possíveis efeitos antagonistas presentes na oleorresina, foram realizados estudos com a presença do antagonista de receptores opioides (naloxona). Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=6), e pré-tratados com morfina 5 mg/kg (s.c.; controle positivo) + naloxona 1 mg/kg (i.p.); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 10 mg/kg) + naloxona 1 mg/kg (i.p.); e ácido poliático (v.o.; 10 mg/kg) + naloxona 1 mg/kg (i.p.).

Os animais foram avaliados nos tempos de 1, 2 e 3 h após o tratamento. Vinte segundos foram adotados como tempo máximo de reação para evitar possíveis danos teciduais aos animais. As respostas foram quantificadas em tempo de latência (s) a resposta ao estímulo de calor.

4.6.4 Modelos de hiperalgesia

a) Procedimento para avaliação da hiperalgesia mecânica através do monofilamento de Von Frey

A avaliação da hiperalgesia foi realizada para a determinação do limiar de tolerância para estímulos mecânicos pelo teste da pressão da pata e teste de von Frey (von FREY, 1894a, 1894b, 1895, 1896) nos animais submetidos à injeção intraplantar de formalina ou carragenina. Estes animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente (9x7x11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 30 min antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada foi obtida através de 10 aplicações (duração de 1 segundo cada) do filamento de Von Frey 0,6 g (VFH,

Stoelting, Chicago, USA) (**Figura 4**). Os estímulos foram realizados na superfície plantar da pata traseira direita e também traseira esquerda do animal, quando necessário objetivando determinar o limiar mecânico basal (B). Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação prévia e novamente reavaliados em diferentes tempos após a injeção de formalina ou carragenina.

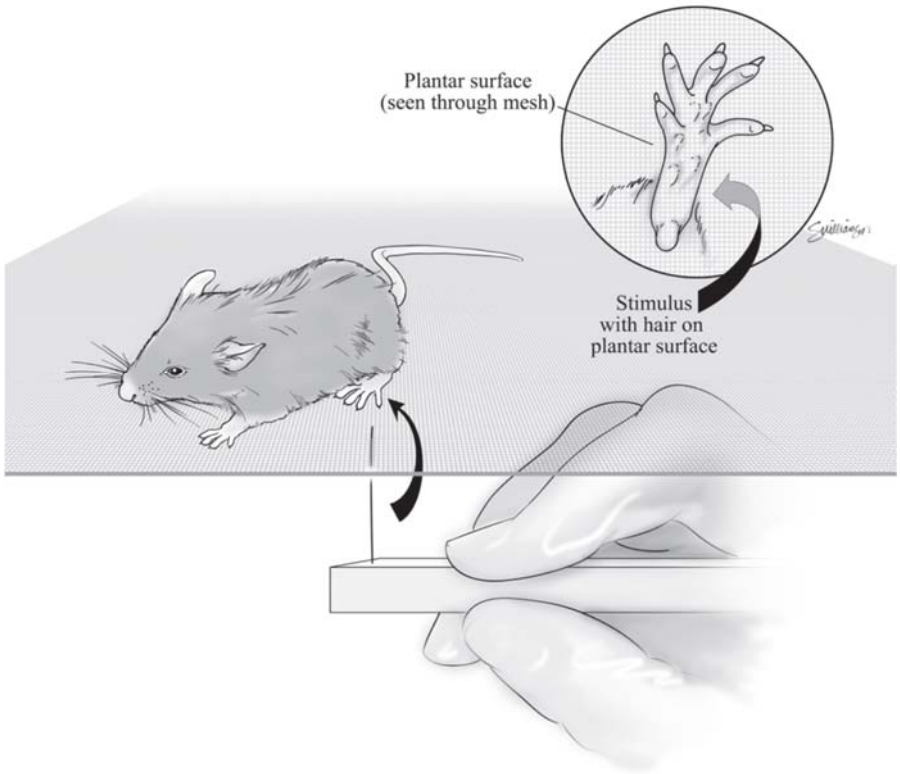


Figura 4. Ilustração da utilização de monofilamentos de von Frey no teste de estimulação mecânica na pata de camundongos.

Fonte: adaptado de Mulder e Prichett (2004)

b) Modelos de hiperalgesia mecânica

Os animais foram divididos em sete diferentes grupos (n=6) e pré-tratados com dexametasona 0,5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); salina (v.o.; controle naïve); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg).

Após 30 minutos dos tratamentos, os animais receberam uma injeção i.pl. de diferentes agentes flogísticos:

1. formalina 2,5% (20 µL/pata) (JENSEN et al., 1986; VIVANCOS et al., 2004);

2. carragenina 15 mg/mL (20 µL/300 µg/pata) (JENSEN et al., 1986; VIVANCOS et al., 2004; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962);

3. dextrana 5 mg/mL (20 µL/100 µg/pata) (JORI; BENTIVOGLIO; GARATFINI, 1961; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982; SHINICHI; KYOICHI; SETSUO, 1978, 1979);

4. lipopolissacarídeo (LPS) 5 µg/mL (20 µL/100 ng/pata) (CUNHA et al., 2008; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 2000; VAJJA et al., 2004) e;

5. zymosan 5 mg/mL (20 µL/100 µg/pata) (AOYAMA et al., 1984a; TARAYRE et al., 1989).

Os animais foram acondicionados em plataforma de Von Frey e avaliados quanto à hipernocicepção com monofilamento de Von Frey nos tempos 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h após a injeção de formalina (JENSEN et al., 1986; VIVANCOS et al., 2004).

c) Modelo de hiperalgesia mecânica associada a avulsão de plexo braquial (APB)

Para a realização da ABP foi utilizado o método descrito por Rodrigues-Filho et al., (2003) e adaptado para camundongos por Quintão et al., (2006). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) e em seguida, o plexo braquial direito foi abordado através de uma incisão longitudinal paralela a clavícula, transcorrendo do esterno a região axilar (1 cm aproximadamente). Os vasos subclávios foram localizados e o tronco inferior foi dissecado. Um grupo de animais teve o tronco inferior pinçado e avulsionado por tração utilizando duas pinças cirúrgicas. No grupo falso-operado, o plexo braquial foi exposto e dissecado sem sofrer qualquer lesão. Por fim a pele do animal foi suturada utilizando fio de sutura de seda 4,0 (**Figura 5**) (Ethicon®, Edinburgh, Scotland, UK).

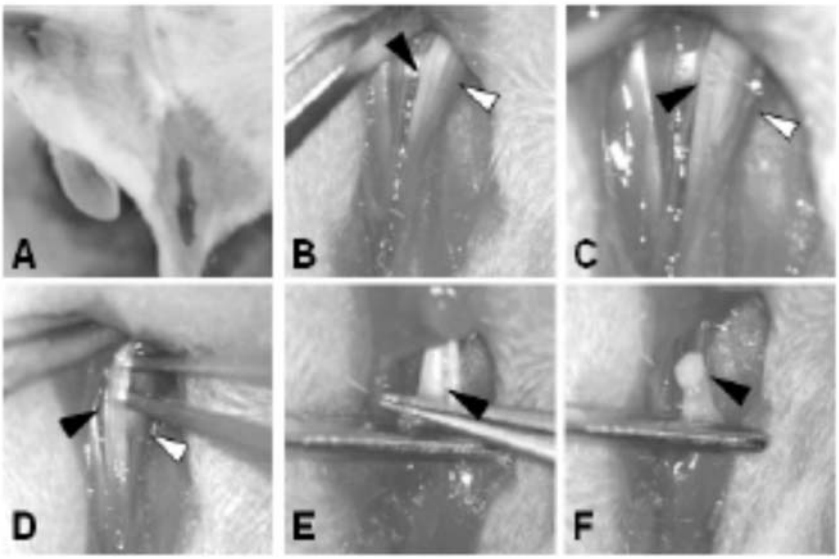


Figura 5. Etapas dos procedimentos cirúrgicos realizados na APB. (**A**) Região da incisão, (**B** e **C**) anatomia do plexo braquial, (**D**) separação de nervos e vasos, (**E**) preensão do tronco inferior, (**F**) avulsão do tronco inferior. Tronco inferior do plexo braquial (setas pretas); vasos subclávios (setas brancas).

Fonte: Adaptado de Quintão et al., 2006.

Após trinta dias do procedimento cirúrgico, os animais operados e falsos operados foram tratados com foram divididos em sete diferentes grupos (n=6) e tratados com gabapentina (v.o.; 400 µmol/kg); dexametasona 0,5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); salina (v.o.; controle naïve, falso-operado); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg), sendo posteriormente avaliados quanto à sensibilização mecânica utilizando o monofilamento de von Frey eletrônico. O tratamento foi realizado sempre pela manhã por cinco dias consecutivos e após 6 horas do tratamento, os animais foram avaliados durante 15 dias.

A fim de investigar a extensão do efeito anti-hiperalgésico da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico, o tratamento foi interrompido cinco dias após a primeira administração e então reiniciada após três dias com o intuito de investigar o desenvolvimento de tolerância.

4.6.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória

a) Modelo de edema de pata

O modelo de edema de pata induzido pela carragenina é um dos primeiros ensaios realizados para o *screening* de atividades anti-inflamatórias (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). Os animais foram divididos em diferentes grupos (n=6) e pré-tratados com dexametasona 5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg).

Uma hora após os tratamentos, o edema foi induzido pela injeção dos agentes flogistícos:

1. carragenina 15 mg/mL (20 µL/300 µg/pata) (JENSEN et al., 1986; VIVANCOS et al., 2004; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962);

2. dextrana 5 mg/mL (20 µL/100 µg/pata) (JORI; BENTIVOGLIO; GARATFINI, 1961; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982; SHINICHI; KYOICHI; SETSUO, 1978, 1979);

3. lipopolissacarídeo (LPS) 5 µg/mL (20 µL/100 ng/pata) (CUNHA et al., 2008; VAJJA et al., 2004) e;

4. zymosan 5 mg/mL (20 µL/100 µg/pata) (AOYAMA et al., 1984; TARAYRE et al., 1989).

Na pata contralateral foram administrados 20 µL de salina para controle. A medida do edema foi mensurada pela diferença entre os volumes deslocados da pata direita e os da pata esquerda em µL/pata, utilizando-se um pletismômetro (EFF 304 – Insight, Ribeirão Preto, Brasil), nos tempos 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h após a injeção de carragenina.

b) Modelo do exsudato da bolsa de ar (Air pouch)

Este modelo permite a observação da migração celular em resposta a um estímulo inflamatório (EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981; SELYE, 1953), simulando uma cavidade sinovial (ROMANO et al., 1997). Os camundongos machos foram anestesiados com xilazina e cetamina, e seus dorsos foram tricotomizados e desinfetados com álcool iodado. Um volume de 4 mL de ar estéril (obtido com filtro 0,22 µm, em fluxo laminar) foi injetado via subcutânea no dorso, formando uma cavidade (bolha). Três dias após, mais 3 mL de ar estéril foram reinjetados. No sexto

dia, os animais foram divididos em diferentes sete grupos (n=6) que serão pré-tratados com dexametasona 0,5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg).

Uma hora após os tratamentos, foram administrados 1 mL de solução contendo os agentes flogísticos:

1. carragenina 15 mg/mL (1 mL/100 µg/) (EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981; SELYE, 1953);

2. dextrana 5 mg/mL (1 mL/100 µg/) (EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981; SELYE, 1953; SHINICHI; KYOICHI; SETSUO, 1978, 1979);

3. zymosan 5 mg/mL (1 mL/100 µg/) (AOYAMA et al., 1984; EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981; PAYÁ et al., 1996; SELYE, 1953)

Cada agente foi solubilizado em salina estéril, e injetado dentro da bolha, sendo que no grupo naïve foi injetado 1 mL de salina. Após quatro horas da injeção de carragenina, os animais foram anestesiados e as cavidades foram cuidadosamente lavadas com 1 mL de salina com EDTA 2 mM, e mantidos em banho de gelo para a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Após a contagem, as amostras foram centrifugadas, sendo o sobrenadante mantido à -20 °C para determinação da enzima mieloperoxidade.

A atividade enzimática da MPO foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação. Sendo que 1 U de mieloperoxidase determinada é capaz de degradar 1 mmol/min de água oxigenada a 25 °C. 60 µL dos sobrenadantes foram aliquotados em microplaca de 96 poços, adicionando-se 200 µL de tampão fosfato contendo 0,167 mg/mL de *O*-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudanças na absorvância a 450 nm foram medidas no tempo 0 e 5 min. A atividade da enzima nas amostras foi determinada através de uma curva padrão de mieloperoxidase. Os resultados foram expressos em unidade de mieloperoxidase por mililitro (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984).

c) Modelos de hiperalgesia inflamatória induzida adjuvante completo de Freund (CFA)

Para induzir a resposta inflamatória persistente nos camundongos, estes receberam injeção i.pl. de 20 µL de adjuvante completo de Freund (CFA; 1 mg/mL de

bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* inativado por calor; cada mililitro (mL) de veículo contém 0,85 mL de óleo de parafina + 0,15 mL de monooleato de manida) na superfície plantar da pata direita traseira (QUINTÃO et al., 2005), sendo que a hiperalgesia mecânica foi avaliada através do monofilamento de von Frey.

Após 24 horas, os animais foram divididos em sete diferentes grupos (n=6) e tratados com gabapentina (v.o.; 400 µmol/kg); dexametasona 0,5 mg/kg (s.c.; controle positivo); indometacina 10 mg/kg (v.o.; controle positivo); salina (v.o.; controle naïve); cremofor 10 % (v.o.; controle negativo); oleorresina de *C. duckei* (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg); e ácido poliático (v.o.; 1, 3 e 10 mg/kg).

Os animais foram acondicionados em plataforma de Von Frey e avaliados quanto à hipernocicepção com monofilamento de Von Frey nos tempos 1, 2, 4, 6 e 12, sendo posteriormente avaliados 1 vez ao dia, 6 horas após o tratamento diário, durante 15 dias.

A fim de investigar a extensão do efeito curativo antinociceptivo da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico, o tratamento foi interrompido cinco dias após a primeira administração e então reiniciada após três dias com o intuito de investigar o desenvolvimento de tolerância (CAO et al., 1998; JENSEN et al., 1986; QUINTÃO et al., 2005).

d) Citotoxidade em linhagem celular imortalizada THP-1

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 15 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. As células foram diferenciadas adicionando-se uma solução de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, 2000 ng/mL) na concentração de 10 µL/mL de meio (2 µL/poço). Após quarenta e oito horas, as células foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg/poço, seus compostos majoritários (β-cariofileno, ácido poliáltico, ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil quínico [14] e ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil) quínico [12]) nas concentrações de 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, e 30,0 µM/poço e os controles positivos com as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 nM/poço, celecoxib e indometacina, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h, 72h e 120h. Após os tempos de incubação, as placas foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do teste por fosfatase ácida

(MARTIN; CLYNES, 1991, 1993). As placas foram lavadas com 100 µL de PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 h a 37 ºC, 5% de CO_2 com uma solução de 4-nitrofenil dissódico hexa-hidrato de fosfato, na concentração de 0,0027 g/mL em 0,1 M de acetato de sódio, 0,1% de Triton X-1 00, pH 5,5. Após a etapa de incubação adicionou-se 50 µL de NaOH a 1 M para interromper a reação. A absorvância foi determinada em leitor de microplacas a 405 nm EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrom, Cambourne, CBE, UK).

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a equação 2. Após o cálculo da viabilidade celular, as concentrações citotóxicas (CC) de 20%, 50% e 80% foram determinadas através de regressão sigmoidal usando dados da média de três poços para cada replicata, sendo o ensaio realizado em três replicatas em dias e idades celulares (passagens) diferentes, através do *software* "OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

e) Determinação de morte celular por iodeto de propídio em linhagem celular imortalizada THP-1

Alíquotas de 600 µL/poço da suspensão celular contendo 285 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 24 poços. As células foram diferenciadas adicionando-se uma solução de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, 2000 ng/mL) na concentração de 10 µL/mL de meio (6 µL/poço). Após quarenta e oito horas, as células foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* ou *C. duckei* nas concentrações de 30 e 100 µg/poço, seus compostos majoritários β-cariofileno, ácido poliáltico, ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil quínico [14] e ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil) quínico [12]) nas concentrações de 3,0 e 10,0 µM/poço, os controles positivos com as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 10 e 50 nM/poço. Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h, 72h e 120h.

A morte celular foi determinada por iodeto de propídio em citometria de fluxo (BD Accuri C6 BD Biosciences, East Rutherford, NJ, EUA) (PICK et al., 2004), utilizando-se os *software* "BD Accuri™ C6 Software para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 1.0.264.21, 2011 (Franklin Lakes, NJ, EUA), e o software "FlowJo® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão X10.0.7r2, 2013 (San Carlos, CA, EUA), sendo expressa por percentual de células vivas e mortas.

f) Determinação de interferon gamma (INF-γ), interleucina 1-beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e em sistema multi-spot em linhagem celular imortalizada THP-1

Alíquotas de 600 µL/poço da suspensão celular contendo 285 x 10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 24 poços. As células foram diferenciadas adicionando-se uma solução de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, 2000 ng/mL) na concentração de 10 µL/mL de meio (6 µL/poço). Após quarenta e oito horas, as células foram tratadas com oleorresina ou extrato das folhas de *C. oblongifolia* ou *C. duckei* nas concentrações de 30 e 100 µg/poço, seus compostos majoritários β-cariofileno, ácido poliáltico, ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil quínico [14] e ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil) quínico [12]) nas concentrações de 3,0 e 10,0 µM/poço, os controles positivos com as substâncias paclitaxel e camptotecina, nas concentrações de 10 e 50 nM/poço. Uma hora após os tratamentos, as placas foram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10 µg/mL (SCHILDBERGER et al., 2013; SONG; PHELPS, 2000). As placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h e 72h. O sobrenadante (alíquotas de 60 µL) foi coletado para dosagem de interferon gamma (INF-γ), interleucina 1-beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e analisado em sistema MSD® Multi-spot Assay System (Meso Scale Discovery, Rockville, USA), processados de acordo com as instruções do fabricante, e interpolados pela quantidade de proteínas totais em cada amostra.

g) Atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc (Ensaio da luciferase)

Visando investigar o possível efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre a atividade específica do NF-κB, foram utilizados macrófagos RAW 264.7-Luc (ATCC® TIB-71®), chamada comumente de RAW-Luc, que expressa o gene repórter luciferase em resposta a expressão de NF-κB (pNF-κB-Luc) (WANG et al., 2014). Em primeiro momento, foi determinada a citotoxicidade em linhagem celular imortalizada RAW-264.7-Luc. Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 1 x 10^5 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. Após vinte e quatro horas, as células foram tratadas com oleorresina de *C. duckei* nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg/poço, ácido poliáltico nas concentrações de 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, e 30,0 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o

controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 24 h e 72h. Após os tempos de incubação, as placas foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do teste por fosfatase ácida (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993). As placas foram lavadas com 100 µL de PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 h a 37 ºC, 5% de CO_2 com uma solução de 4-nitrofenil dissódico hexa-hidrato de fosfato, na concentração de 0,0027 g/mL em 0,1 M de acetato de sódio, 0,1% de Triton X-1 00, pH 5,5. Após a etapa de incubação adicionou-se 50 µL de NaOH a 1 M para interromper a reação. A absorvância foi determinada em leitor de microplacas a 405 nm EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrom, Cambourne, CBE, UK).

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a equação 2. Após o cálculo da viabilidade celular, as concentrações citotóxicas (CC) de 20%, 50% e 80% foram determinadas através de regressão sigmoidal usando dados da média de três poços para cada replicata, sendo o ensaio realizado em três replicatas em dias e idades celulares (passagens) diferentes, através do *software* “OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)”, versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Em outra etapa, alíquotas de 500 µL/poço da suspensão celular contendo 4 x 10^5 células/mL (2 x 10^5 células/poço) foram acondicionadas em placas de 24 poços. Após vinte e quatro horas, as células foram tratadas com oleorresina de *C. duckei* nas concentrações de 30 e 100 µg/poço e ácido poliáltico nas concentrações de 10,0, e 30,0 µM/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o controle negativo (meio). Após 30 min as células foram incubadas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1 µg/mL (500 ng/poço) (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015) ou peptideoglicano (PGN) na concentração de 1 µg/mL (500 ng/poço) (FRANCHIN et al., 2016) durante 6 horas, a 37 ºC, 5% de CO_2. Após este período, o meio foi removido, lavadas com PBS gelado e as células lisadas com auxílio de êmbolo de seringa de insulina, sendo que 50 uL de tampão de lise celular, TNT contendo deTris-HCl 10 mM a pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, e Triton a 1%, durante 5 min a 4ºC. 10 µL desta solução foi aliquotada em placa de 96 poços e adicionados de 25 µL de tampão contendo a solução de substrato para luciferase (kit de sistema de ensaio de luciferase, *Dual Luciferase Reporter assay system*, Promega, Fitchburg, WI, USA), e em seguida levado ao luminomêtro para o registro da intensidade luminosa (Victor X5, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A atividade da luciferase foi expressa através do

aumento do *fold* de luciferase comparado com o controle, correspondente à ativação do NF-κB (PINHO-RIBEIRO et al., 2016).

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.), e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, sendo utilizado como pós-teste o método de Tukey, Dunnet, Newman-Keuls ou Bonferroni. As doses inibitórias 50% (DI_{50}) foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear (ZAR, 2010), utilizando-se o *software* "GraphPad Prism® para sistema operacional Windows (64 bits)", 2007, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ou "OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA). As concentrações citotóxicas (CC) de 20%, 50% e 80% foram determinadas através de regressão sigmoidal usando dados da média de três poços para cada replicata, sendo o ensaio realizado em três replicatas em dias e idades celulares (passagens) diferentes, através do *software* "OriginPro® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 9.1, 2013 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento das coletas da oleorresina das espécies de *Copaifera* spp.

A coleta da oleorresina de *C. oblongifolia* ocorreu em intervalos de aproximadamente 30 dias a partir de 04/06/2012 até 04/12/2012. Ao final deste período, foram obtidos 15,36 g de um líquido transparente, viscoso e de coloração marrom avermelhada. A coleta da oleorresina de *C. duckei* ocorreu no dia 03/10/2012, onde foram obtidos aproximadamente dois litros de um líquido transparente, viscoso e de coloração amarela (**Figura 6**).

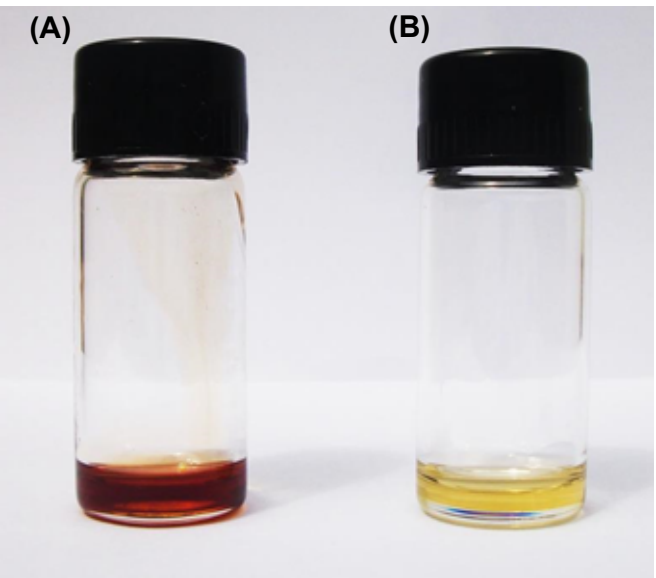


Figura 6. Aspecto físico das oleorresinas de *Copaifera*. Em A, oleorresina de *C. oblongifolia* e em B, oleorresina de *C. duckei*.

Fonte: a autora

5.2 Rendimento dos extratos hidroalcoólicos e partições das espécies de *Copaifera* spp.

O extrato hidroalcoólico do pó fino das folhas de *C. oblongifolia* (1000 g) apresentou rendimento de 30,12 % (301,28 g) de extrato bruto, após liofilização. Uma alíquota (50 g) deste extrato foi submetida ao processo de partição líquido-líquido obtendo-se as seguintes frações de acordo com a **Tabela 3**:

Tabela 3. Rendimentos das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia.*

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
hexânica	4,2697	8,53
diclorometânica	2,4932	4,98
acetato de etila	5,4668	10,93
butanólica	4,5590	9,12
aquosa	23,2172	46,23

Já o extrato hidroalcoólico do pó fino das folhas de *C. duckei* (300g) apresentou um rendimento de 34,83 % (104,49 g). Para a obtenção das partições do extrato hidroalcoólico bruto de *C. duckei*, 50 g do extrato foram submetidos ao mesmo processo descrito acima. As massas e rendimentos das partições podem ser observados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Rendimentos das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. duckei*

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
hexânica	2,6913	5,38
diclorometânica	4,5695	9,19
acetato de etila	10,8147	21,62
butanólica	10,5547	21,10
aquosa	10,1549	20,30

5.2.1 Análise da composição das oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* por CG-EM

As análises da composição química das oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* revelaram até o presente momento um predomínio de componentes químicos da classe dos sesquiterpenos. Segundo a literatura, a oleorresina das espécies de *Copaifera* é composta quase que na sua totalidade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (90%) e diterpenos (BIAVATTI et al., 2006; LIMA-NETO; GRAMOSA; SILVEIRA, 2008; TAPPIN et al., 2004; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007).

De acordo com a análise dos componentes voláteis presentes na oleorresina de *C. oblongifolia* observa-se a presença de 19 substâncias (**Tabela 5**), das quais sete foram identificadas comparando-se com a literatura, com o cálculo de van Den Dool e Kratz (1963), e com os bancos de dados espectrais.

Tabela 5. Composição química da oleorresina de *C. oblongifolia* no método A

Pico (n.)	Substância [(a)]	Tempo de retenção (min)	*RI* [(b)]	Concentração (%)
1	β-elemeno	23,241	1386,01	14,71
2	α-bergamoteno <*trans*>	25,066	1429,73	11,00
3	β-fameseno <*trans*>	27,132	1479,88	0,75
4	β-selineno	27,286	1483,62	7,91
5	β-bisaboleno	28,148	1504,74	37,69
6	α-bergamotol <*trans*>	28,809	1521,49	1,06
7	óxido de cariofileno < *trans*>	30,941	1575,52	6,35
9	derivado do cariofileno *não identificado*	32,060	1604,07	2,88
10	derivado do cariofileno *não identificado*	32,254	1609,23	0,65
11	derivado do cariofileno *não identificado*	32,381	1612,61	1,01

[a] As substâncias listadas estão em ordem de eluição na coluna DB-5MS. [b] RI: Índice de retenção relativa (série de n-alcanos C9 a C25).

O componente volátil mais abundante é o β-bisaboleno (37,69%), seguido do β-elemeno (14,71%) e do β-bergamoteno (11,00%). Ainda, baseando-se no padrão de fragmentação encontrado, sugere-se que três substâncias, ainda não identificadas, sejam isômeros do sesquiterpeno bicíclico β-cariofileno, pois apresentam o perfil de fragmentação compatível com a presença do anel ciclobutano. Na análise pelo método modificado, foi possível constatar apenas as 19 substâncias já apresentadas na análise anterior, pelo método de Adams (2007) clássico.

A olerresina de *C. duckei* apresentou um perfil fitoquímico mais complexo, no qual observou-se a presença de 33 componentes voláteis, dos quais 20 substâncias foram identificadas (**Tabela 6**). *O* componente volátil mais abundante de acordo com esta análise é o β-cariofileno (14,51%), seguido do β-bisaboleno (14,06%) e do β-selineno (5,90%).

Tabela 6. Composição química da oleorresina de *C. duckei* no método A

Pico (n.)	Substância [(a)]	Tempo de retenção (min)	*RI* [(b)]	Concentração (%)
1	α-ylangeno	22,366	1365,62	0,13
2	β-elemeno	23,244	1386,08	2,67
3	α-gurjuneno	23,749	1397,86	0,74
4	β-cariofileno	24,493	1415,83	14,51
5	α-bergamoteno <*trans*>	25,101	1430,58	5,56
6	α-guaieno	25,158	1431,97	5,12
7	guaia-6,9-diene	25,387	1437,52	1,04
8	α-humuleno	25,936	1450,85	3,10
9	4,11-selinadieno	26,696	1469,30	0,91
10	γ-muuroleno	26,760	1470,85	0,55
12	β-bergamoteno <*trans*>	27,150	1480,32	0,38
13	β-selineno	27,319	1484,42	5,90
14	α-selineno	27,604	1491,33	3,76
16	α-sisaboleno <*cis*>	27,858	1497,50	2,22
17	β-sisaboleno	28,196	1505,96	14,06
18	γ-cadineno	28,302	1508,64	0,70
19	δ-cadineno	28,530	1514,42	0,92
21	β-sesqui-felandreno	28,768	1520,45	0,69
25	1-nafetalenol	35,329	1691,01	0,15
31	(-)-metil polialtato	55,999	2339,88	0,94

[a] As substâncias listadas estão em ordem de eluição na coluna DB-5MS. [b] RI: Índice de retenção relativa (série de n-alcanos C9 a C25)

Na análise pelo método modificado, além das substâncias descritas anteriormente, foi possível observar a presença do ácido poliáltico (**Tabela 7**), um diterpeno ácido que está presente na concentração de 21,72%, sendo este o componente majoritário da oleorresina de *C. duckei.*

Tabela 7. Composição química da oleorresina de *C. duckei* no método B

Pico (n.)	Substância [(a)]	Tempo de retenção (min)	*RI* [(b)]	Concentração (%)
37	ácido *ent*-poliáltico	45,703	2457,76	21,72

[a] As substâncias listadas estão em ordem de eluição na coluna DB-5MS
[b] RI: Índice de retenção relativa (série de n-alcanos C21 a C40)

Em trabalhos anteriores, o sesquiterpeno mais encontrado nas oleorresinas de *Copaifera* spp. é o β-cariofileno, que é composto responsável pelo odor lenhoso (SKÖLD et al., 2006; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). Além disso, outros dois sesquiterpenos destacam-se como majoritários: o α-copaeno e o α-humuleno, que podem ser caracterizados como marcadores químicos (PINTO et al., 2000; SOUSA et

al., 2011). O diterpeno do tipo de labdano, ácido copálico, também é considerado como um dos marcadores químicos, sendo comumente encontrado nas oleorresinas das copaíbas (SOUSA et al., 2011; TAPPIN et al., 2004; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). De acordo com os dados apresentados, ainda não foi possível identificar o β-cariofileno na amostra de *C. oblongifolia*, embora sejam encontradas três substâncias que sejam seus isômeros. Ainda, não se pode generalizar que o β-cariofileno seja o composto majoritário de todas as oleorresinas de *Copaifera* spp., pois, como pode-se observar na oleorresina de *C. duckei,* o ácido poliáltico é o componente majoritário.

5.2.2 Análise qualitativa (desreplicação) das oleorresinas, extratos e partições das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*

Após a análise das oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* por UHPLC-(ESI)-HRMS foi possível realizar a desreplicação de algumas substâncias, baseada no espectro de massa de alta resolução (massa exata e espectro de fragmentação), sendo que pela análise realizada na coluna Ascentis Express® C18 (Supelco, Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, USA) foram identificados 27 componentes dos extratos e oleorresinas, e pela análise realizada na coluna Synergi® Polar-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA) (apenas os extratos) foram identificados 26 componentes. Para algumas substâncias foi possível propor a identificação exata (nome da substância), baseando-se em parâmetros como a massa exata, o padrão de fragmentação (modo positivo e/ou negativo) e, principalmente, na relação destes parâmetros com substâncias já descritas para as espécies, gênero e/ou família Fabaceae. Os resultados da etapa de desreplicação são apresentados nas **Tabelas 8** e **9**.

Das substâncias identificadas para as oleorresinas de *C. duckei* e *C. oblongifolia*, algumas já são descritas para oleorresinas destas espécies e/ou outras do gênero *Copaifera*, como por exemplo, o ácido *ent*-agático, ácido di-hidroagático, ácido copaiferólico, ácido caurenoico, ácido (5β, 7α, 8α, 9β, 10α, 13α, 14R)-7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico, ácido 7α-hidroxi-hardwíckiico, ácido *ent*-poliáltico e ácido hardwíckiico, o que indica a grande similaridade qualitativa na composição química das oleorresinas de *Copaifera* spp (BONAN et al., 2015; CARVALHO et al., 2005; CASCON; GILBERT, 2000; CAVALCANTI et al., 2006; IZUMI et al., 2012; LIMA

et al., 2003b; ROMERO, 2007; SANTIAGO et al., 2015; TRINDADE et al., 2013; VEIGA-JÚNIOR et al., 2001; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007).Das substâncias identificadas para as oleorresinas de *C. duckei* e *C. oblongifolia*, algumas já são descritas para oleorresinas destas espécies e/ou outras do gênero *Copaifera*, como por exemplo, o ácido *ent*-agático, ácido di-hidroagático, ácido copaiferólico, ácido caurenoico, ácido (5β, 7α, 8α, 9β, 10α, 13α, 14R)-7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico, ácido 7α-hidroxi-hardwíckiico, ácido *ent*-poliáltico e ácido hardwíckiico, o que indica a grande similaridade qualitativa na composição química das oleorresinas de *Copaifera* spp (BONAN et al., 2015; CARVALHO et al., 2005; CASCON; GILBERT, 2000; CAVALCANTI et al., 2006; IZUMI et al., 2012; LIMA et al., 2003; ROMERO, 2007; SANTIAGO et al., 2015; TRINDADE et al., 2013; VEIGA-JÚNIOR et al., 2001; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007).

Tabela 8. Composição química das oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na coluna Ascentis Express® C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) hidróxido de amônio-metanol-acetonitrila 0,1:89,9:10, com eluição em modo gradiente de acordo com a **Tabela 1**. Vazão: 0,5 mL/min.

Nº	FM	Massa monoisotópica	Substância sugerida	TR (min)	Observação	Amostra
1	$C_7H_{12}O_6$	192,0634	Ácido quínico	1,90	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	ECO; ECD
2	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1006	Quercitrina	2,61	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	ECO; ECD
3	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,1056	Afzelina	3,09	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	ECO; ECD
4	$C_{18}H_{16}O_7$	344,0896	Quercetina 3,4',7-trimetil éter	6,40	Substância descrita em *Distemonanthus benthamianus* (subfamília Caesalpinioideae)	ECD
5	$C_{20}H_{28}O_5$	348,1937	Ácido (5β, 7α, 8α, 9β, 10α, 13α, 14R)-7,14-dihidróxi-15-oxokaur-16-en-19-óico	7,76	Substância descrita para óleorresina de *Copaifera* spp.	OCO
6	$C_{20}H_{28}O_5$	349,1937	*Neocaesalpin H* ou Giberilina A53	7,85	Substâncias descritas em espécies da família Fabaceae	ECD
7	$C_{20}H_{28}O_5$	349,1937	*Neocaesalpin H* ou Giberilina A53	8,03	Substâncias descritas em espécies da família Fabaceae	ECD
8	$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Flavonoide	8,50	-	ECD
9	$C_{20}H_{28}O_4$	332,1988	Ácido 7α-hidroxi-hardwíckiico	8,70	Substância isolada de oleorresina de *Copaifera* spp.	OCD
10	$C_{18}H_{39}NO_3$	317,2930	Substância nitrogenada	8,91	-	OCD; ECO; ECD
11	$C_{24}H_{30}O_6$	414,2042	*Caesaldekarin E*	9,25	Substância descrita em espécies do gênero *Caesalpinia* (subfamília Caesalpinioideae)	OCD
12	$C_{15}H_{28}O_3$	256,2042	Sesquiterpeno oxigenado	9,48	-	OCD
13	$C_{28}H_{37}NO_4$	451,2723	Substância nitrogenada	9,88	-	ECD
14	$C_{20}H_{30}O_3$	318,2195	*(+)-(3R,8S,9R,10S)-3-Hydroxylabda-5,13-dien-15,16-olide* ou *(−)-*	10,72	Substâncias descritas em espécies de *Copaifera* spp.	ECO

			(3S,4R,5S,8R,9S,10R)-3,4-Epoxyclerodane-13-en-15,16-olide			
15	$C_{20}H_{30}O_3$	318,2195	*(+)-(3R,8S,9R,10S)-3-Hydroxylabda-5,13-dien-15,16-olide* ou *(−)-(3S,4R,5S,8R,9S,10R)-3,4-Epoxyclerodane-13-en-15,16-olide*	10,89	Substâncias descritas em espécies de *Copaifera* spp.	OCO; ECO
16	$C_{20}H_{30}O_3$	318,2195	Diterpeno ácido	11,46	-	OCO
17	$C_{20}H_{30}O_4$	334,2144	Ácido *ent*-agático	11,58	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	OCD, ECD
18	$C_{20}H_{43}NO_3$	345,3243	Substância nitrogenada	11,85	-	OCD; ECD
19	$C_{20}H_{43}NO_3$	345,3243	Substância nitrogenada	11,85	-	ECO
20	$C_{20}H_{32}O_4$	336,2301	Ácido di-hidroagático	12,10	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	OCD
21	$C_{20}H_{32}O_3$	320,2351	Ácido copaiferólico	13,36	Substância descrita de *Copaifera multijuga*	OCO
22	$C_{21}H_{32}O_4$	348,2301	Ácido 15-metil-ester-kovál ico	14,31	Substância isolade de *Gossweilerodendron balsamiferum* (subfamília Caesalpinioideae)	OCD
23	$C_{20}H_{28}O_3$	316,2038	Ácido poliáltico ou hardwíckiico	14,72	Substâncias descritas em espécies de *Copaifera* spp.	OCD; ECD
24	$C_{20}H_{34}O_2$	306,2559	Ácido catívico	16,63	Substância descrita de *Prioria copaifera* (subfamília Caesalpinioideae)	OCD
25	$C_{20}H_{30}O_2$	302,2246	Ácido caurenoico	17,22	Substância descrita em *Copaifera duckei* e outras espécies de *Copaifera* spp.	OCO; OCD
26	$C_{22}H_{54}N_6O_8$	530,4003	Substância nitrogenada	18,69	-	OCD
27	$C_{28}H_{42}O_2$	410,3185	β-tocotrienol ou γ-tocotrienol	20,12	-	OCO
28	$C_{36}H_{44}O_9$	620,2985	*Dichrostachine F*	21,34	Substância descrita em *Dichrostachys cinérea* (família Fabaceae)	ECD

Legenda: OCO: oleorresina de *C. oblongifolia*; OCD: oleorresina de *C. duckei*; ECO: extrato de *C. oblongifolia*; ECD: extrato de *C. duckei.*

Tabela 9. Composição química dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na coluna Synergi® Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) iso-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6, com eluição em modo gradiente de acordo com a **Tabela 2**. Vazão: 0,68 mL/min.

Nº	FM	Massa monoisotópica	Substância sugerida	TR (min)	Observação	Amostra
1	$C_7H_{12}O_6$	192,0634	Ácido quínico	0,86	Substância descrita em espécies de Copaifera spp.	ECO; ECD
2	$C_{14}H_{16}O_{10}$	344.0743	Derivado galoilquínico	0,98	-	ECO; ECD
3	$C_{14}H_{16}O_{10}$	344.0743	Derivado galoilquínico	1,60	-	ECO; ECD
4	$C_{15}H_{18}O_{10}$	358.0900	Derivado galoilquínico (monometilado)	1,62	-	ECO
5	$C_{15}H_{18}O_{10}$	358.0900	Derivado galoilquínico (monometilado)	1,76	-	ECO; ECD
6	$C_{15}H_{18}O_{10}$	358.0900	Derivado galoilquínico (monometilado)	2,67	-	ECO
7	$C_{15}H_{18}O_{10}$	358.0900	Derivado galoilquínico (monometilado)	2,94	-	ECO; ECD
8	$C_{21}H_{20}O_{14}$	496.0853	Ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico	2,99	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
9	$C_{21}H_{20}O_{14}$	496.0853	Ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico	4,66	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
10	$C_{18}H_{26}O_{10}$	402.1526	Benzil heterosídeo	4,91	-	ECO
11	$C_{18}H_{26}O_{10}$	402.1526	Benzil heterosídeo	4,96	-	ECO
12	$C_{21}H_{20}O_{14}$	496.0853	Ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico	5,36	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
13	$C_{22}H_{22}O_{14}$	510.1010	Derivado di-*O*-galoilquínco (monometilado)	6,15	-	ECO; ECD
14	$C_{22}H_{22}O_{14}$	510.1010	Ácido 5'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico	7,98	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
15	$C_{22}H_{22}O_{14}$	510.1010	Ácido 5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico	8,86	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD

16	$C_{28}H_{24}O_{18}$	648.0963	Ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico	10,58	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
17	$C_{23}H_{24}O_{14}$	524.1166	Ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico	13,36	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
18	$C_{29}H_{26}O_{18}$	662.1119	Ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico	13,89	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
19	$C_{23}H_{24}O_{14}$	524.1166	Ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico	14,26	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
20	$C_{29}H_{26}O_{18}$	662.1119	Derivado tri-*O*-galoilquínco (monometilado)	14,91	-	ECO; ECD
21	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442.0900	Epicatequina 3-*O*-galato ou epicatequina 5-*O*-galato	16,85	Substâncias descritas para espécies da família Fabaceae	ECO; ECD
22	$C_{30}H_{28}O_{18}$	676.1276	Derivado tri-*O*-galoilquínco (dimetilado)	17,80	-	ECO; ECD
23	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.1006	Quercitrina	19,88	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	ECO; ECD
24	$C_{31}H_{30}O_{18}$	690.1432	Ácido 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico	21,17	Substância descrita em *Copaifera langsdorffii*	ECO; ECD
25	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432.1056	Afzelina	23,03	Substância descrita em espécies de *Copaifera* spp.	ECO; ECD
26	$C_{18}H_{39}NO_3$	317.2930	Substância nitrogenada	32,22	-	ECO; ECD

Legenda: ECO: extrato de *C. oblongifolia*; ECD: extrato de *C. duckei.*

Um fato relevante na desreplicação da oleorresina de *C. duckei* e que merece ser mencionado é presença de 3 componentes não identificados quanto a substância exata, mas que se apresentam em uma proporção considerável nesta oleorresina e cujas fórmulas moleculares, baseadas na massa exata obtida pelos íons quase moleculares em ambos modos de ionização ($[M+H]^+$ e $[M-H]^-$), em especial no modo positivo, indicam a presença de nitrogênio nas moléculas dessas substâncias. A busca nos bancos de dados utilizados para a realização da desreplicação utilizando as fórmulas moleculares calculadas para essas substâncias obteve como resultados alguns *hits*, contudo, nenhum destes foi descrito para o gênero *Copaifera*, o que torna esse achado relevante como justificativa para um estudo fitoquímico mais aprofundado da oleorresina de *C. duckei*.

Dentre as substâncias propostas para os componentes dos extratos hidroalcóolicos após a análise destes em ambas as colunas, por diferentes gradientes de eluição, destacam-se os flavonoides, especialmente quercitrina e afzelina, e derivados galoilquínicos como os constituintes majoritários dos extratos. Tanto os flavonoides quanto os derivados galoilquínicos já são bem descritos na literatura como presentes nas folhas de espécies do gênero *Copaifera*, especialmente *Copaifera langsdorffii*, sendo que principalmente para os derivados galoilquínicos, muitas dessas substâncias foram isoladas pela primeira vez dos extratos das folhas desta espécie do gênero *Copaifera* (FURTADO et al., 2015; LEMOS et al., 2015; NOGUEIRA; FURTADO; BASTOS, 2015; TRINDADE et al., 2013). Considerando a proximidade filogenética de *C. duckei* e *C. obloginfolia* com *C. langsdorffi*, a presença de tais substâncias nos extratos analisados era esperada e condiz com a quimiossistemática do gênero.

As demais substâncias descritas para os extratos e oleorresinas, detectou-se a presença de diterpenos diferentes daqueles descritos anteriormente, como os ácidos 15-metil-ester-kolávico e catívico (oleorresina de *C. oblongifolia*), um flavonoide identificado como quercetina 3,4',7-trimetil éter e outro não identificado (extrato de *C. duckei*), além de uma substância cuja massa exta e o padrão de fragmentação sugerem que seja a epicatequina 3-*O*-galato ou epicatequina 5-*O*-galato. Outras substâncias também foram detectadas e suas fórmulas moleculares calculadas a partir de suas massas exatas, contudo não foi possível uma identificação inequívoca das mesmas, de forma que estas são citadas nas **Tabelas 8 e 9**, mas a proposta de

identificação é um pouco especulativa, baseando-se em substâncias já descritas para outras espécies da família Fabaceae.

5.3 Avaliação da atividade toxicológica

5.3.1 Efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares CHO-k1 e L929

O Brasil é um país continental que possui a maior diversidade genética vegetal do planeta. De acordo com dados da literatura atual, devido à essa grandeza de biodiversidade, grande parte ainda permanece não estudada dos pontos de vista botânico, químico, farmacológico ou toxicológico (ALMEIDA, 2011). Este fato é de extrema preocupação, pois casos de intoxicação por plantas representam um problema de saúde pública. No ano de 2003, segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), foram registrados 99016 casos de intoxicações, sendo que destes, 1185 foram causadas pelo uso indevido de plantas (SINITOX, 2003). O saber popular, muitas vezes não representa riscos para a saúde, reforçando ainda mais a necessidade de estudos toxicológicos, garantindo a segurança no uso de produtos de origem vegetal.

Visando a implantação de estudos toxicológicos, existe atualmente a necessidade da implementação de métodos eficazes que possam substituir o uso de animais. Esta discussão sobre o uso de métodos alternativos já data de 57 anos atrás, a partir da publicação do livro *Principles of Human Experimental Technique*, de W.M.S. Russell e R.L. Burch em 1959, onde se estabelece o princípio dos 3R's: *Refinament* (Refinamento), *Reduction* (Redução) e *Replacement* (Substituição). Respectivamente, estas três ações estabelecem o alívio ou minimização da dor e estresse em animais, redução do número de animais utilizados no experimento, obtendo-se a mesma qualidade de informação e a substituição de ensaios em animais através de métodos alternativos (BRASIL, 2014; CONCEA, 2015; FLECKNELL, 2002; RUSSELL; BURCH, 1959; SAÚDE, 2009).

Diversas instituições internacionais renomadas, tais como a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), descrevem protocolos com métodos alternativos já validados para uso *in vitro* de células eucariontes, tais como exemplo ensaio de micronúcleo e de citotoxicidade (BRASIL, 2014).

Os ensaios *in vitro* apresentam maior vantagem quando comparados aos ensaios in vivo, permitindo maior reprodutibilidade dos resultados, simplicidade e rapidez, diminuição dos custos e diminuição do uso de animais. Além disso, os bancos de células dispõem de uma grande variedade de linhagens, possibilitando a avaliação em diferentes tipos celulares, podendo assim substituir testes de toxicidade aguda *in vitro*, reduzindo o número de amostras a serem testadas em animais (BERNAUER et al., 2005). Sendo assim, buscando implementar tais métodos de investigação *in vitro* de atividades toxicológicas de plantas medicinais, foram utilizadas a linhagem CHO-k1 e a linhagem L929 para ensaios preliminares de atividade citotóxica.

Na literatura científica, testes de atividade citotóxica geralmente são realizados através de ensaios colorimétricos, utilizando-se leitores de microplaca. Existem vários métodos para essa avaliação em cultura de células, tais como os ensaios utilizando-se os corantes resazurina ou vermelho neutro. Porém, a maioria dos testes tradicionais possuem algumas limitações, tais como a necessidade de alta densidade celular, o que não permite a observação citotóxica por longos períodos, além de trabalhosos por necessitarem de diversas etapas, resultando em atraso na obtenção dos resultados, limitando, de alguma forma, o número de substâncias e parâmetros que poderiam ser analisados e testados (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993).

Diante destes fatores, neste trabalho foram selecionados o teste de citotoxicidade por fosfatase ácida, por ser considerado um teste simples, que envolve poucas etapas e reagentes na sua execução e por apresentar grande reprodutibilidade e exatidão (MARTIN; CLYNES, 1991, 1993).

O princípio do método se baseia no fato de que o reagente 4-nitrofenil dissódico hexa-hidrato de fosfato (pNPP) é amplamente utilizado como substrato para determinar a atividade catalítica de várias fosfatases. O grupo fosfato de pNPP é clivado pela enzima para produzir *p*-nitrofenol, o que também é incolor uma vez que o máximo comprimento de onda de excitação para a eletrônica de *p*-nitrofenol meio aquoso é 318 nm. No entanto, em condições alcalinas, o *p*-nitrofenol é convertido para o ânion de *p*-nitrofenolato, resultando em um desvio batocrômico (a alteração na absorvância de um composto a um comprimento de onda maior com base em condições de solução) para cerca de 400 nm. Este é na extremidade azul do espectro eletromagnético, mas uma vez que vê a cor da luz refletida (em oposição à luz absorvida), a solução em amarelo (**Figura 7**).

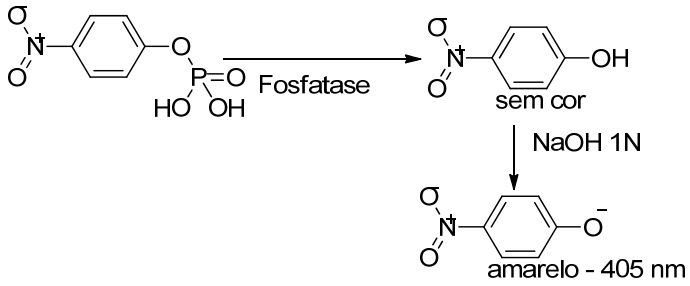


Figura 7. Representação esquemática da reação catalisada por fosfatase para formação do *p*-nitrofenolato
Fonte: a autora, editado em *software* "ChemBioDraw® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 12.0, 2007 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

A linhagem celular CHO-k1 é originada a partir de uma linhagem CHO parental a através da biopsia do ovário do hamster Chinês adulto, e são frequentemente utilizadas na investigação biológica e médica, sendo comercialmente empregadas na produção de proteínas terapêuticas, estudos genéticos, toxicológicos, nutricionais e na expressão de proteínas recombinantes (JAYAPAL et al., 2007). As culturas obtidas a partir deste material biológico oferecem um padrão de crescimento excelente e pode crescer de forma continua durante mais de 10 meses (PUCK; CIECIURA; ROBINSON, 1958).

A linhagem celular L929 foi uma das primeiras linhagens celulares estabelecidas em cultura imortalizada. É derivada do clone da geração 95 de tecido subcutâneo areolar e adiposo de um camundongo macho com 100 dias de idade e pode ser utilizada para reportar ensaios de citotoxicidade (SANFORD; EARLE; LIKEKY, 1948).

Além disso, as duas linhagens celulares acima destacadas são linhagens celulares imortalizadas não neoplásicas, ou seja, apresentam metabolismo mais próximo ao metabolismo normal, quando comparadas com células imortalizadas neoplásicas. Atualmente é importante se estabelecer a atividade citotóxica em ambas as linhagens, direcionando ou não o estudo mais aprofundado de atividades quimioterápicas, bem como verificando se há maior seletividade para células que possuem metabolismo tumoral.

Sendo assim, com base na seleção de métodos que permitem a investigação citotóxica por um período maior *in vitro*, foram realizadas em três replicatas distintas, com células com passagens diferentes. Cada teste foi realizado em triplicata utilizando-se como método para revelação o ensaio por fosfatase ácida. Os dados foram coletados em três diferentes tempos: 24 72 e 120 h. Também, buscando-se

investigar a potência toxicológica das oleorresinas, extratos e substâncias isoladas foram determinadas a concentração citotóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}).

A partir destes experimentos é possível observar uma diminuição do CC_{20}, CC_{50} e CC_{80} no decorrer do tempo apresentando valores mais baixos no período de 120 horas. Estes dados permitem afirmar que a citotoxicidade em células CHO-k1 (**Tabela 10**) e em células L929 (**Tabela 11**) é dose-tempo-dependente.

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que para ambas as linhagens testadas os valores de CC_{20}, CC_{50} e CC_{80} demonstraram valores reduzidos nos tempos de 24 e 72 horas, porém com decaimento significativo em 120 horas. Isso demonstra a importância da investigação de atividades citotóxicas por tempos maiores de exposição, uma vez que mecanismos apoptóticos e necróticos podem ser expressos em períodos maiores de 24 horas, dependendo do tipo de célula e do metabolismo celular (MAJNO; JORIS, 1995).

Neste sentido, as linhagens CHO-k1 e L929, apesar de linhagens de origem tecidual diferente, apresentaram o mesmo perfil de resultados, no mesmo período avaliado, sugerindo que os efeitos citotóxicos sejam mais específicos em células não neoplásicas (ver resultados adiante em células neoplásicas, **Tabela 23** e **25** em células AGS, **Tabela 43** em células THP-1, e **Tabela 45** em células RAW264.7-Luc). Também, vale ressaltar os efeitos dos controles positivos. Foram utilizados neste estudo o paclitaxel e a camptotecina, substâncias com conhecida atividade citotóxica e utilizadas na clínica como antineoplásicos, além da investigação dos efeitos citotóxicos dos anti-inflamatórios não esteroidais, celecoxib e indometacina, utitlizados para a investigação da atividade anti-inflamatória atráves do sistema *multi-spot* (ver resultados adiante, **Figuras 72**, **73**, **74**, **75** e **76**).

Tabela 10. Valores de concentração citototóxica 20% (CC20), 50% (CC50) e 80% (CC80) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido polialtico e os controles citotóxicos paclitaxel, camptotecina, celecoxib e indometacina no teste de viabilidade celular em linhagem celular CHO-k1 por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Substância \ Tempo		24h		72h		120h	
			R^2		R^2		R^2
Oleorresina de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	36,14±5,41	0,943	31,93±9,01	0,976	13,15± 1,57	0,992
	CC_{50}	652,91±19,91		162,24±13,85		138,82±5,11	
	CC_{80}	2000,75±37,47		793,54±35,70		603,47±6,70	
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	46,60±12,21	0,961	45,64±12,22	0,918	42,22±8,28	0,913
	CC_{50}	1255,81±29,66		913,34±21,78		444,96±10,79	
	CC_{80}	3838,62±44,02		1273,84±34,62		846,72±23,03	
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	68,28±3,59	0,946	42,68±5,05	0,984	11,78±0,89	0,832
	CC_{50}	679,51±19,64		550,46±15,19		188,63±4,12	
	CC_{80}	5779,55±18,09		10817,54±40,98		666,49±14,01	
Extrato das folhas de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	64,96±25,95	0,935	41,85±3,64	0,938	29,06±9,89	0,997
	CC_{50}	909,02±33,81		138,00±13,75		109,75±13,91	
	CC_{80}	1940,59±35,73		695,02±32,00		293,18±23,68	
Ácido poliáltico (µM)	CC_{20}	8,19±1,61	0,817	2,53±1,07	0,936	2,35±0,44	0,972
	CC_{50}	315,83±7,69		43,00±14,03		36,87±6,23	
	CC_{80}	1271,43±16,57		576,74±2,57		416,24±7,15	
Paclitaxel (*n*M)	CC_{20}	10,14±2,23	0,952	3,93±1,28	0,961	0,30±0,47	0,965
	CC_{50}	135,21±9,92		24,24±4,68		22,62±3,52	
	CC_{80}	180,41±23,95		167,74±11,20		149,30±15,42	
Camptotecina (*n*M)	CC_{20}	17,15±3,17	0,897	14,80±3,18	0,953	11,79±5,08	0,966
	CC_{50}	174,86±14,82		157,92±19,71		147,08±19,09	
	CC_{80}	260,94±35,21		206,66±19,36		156,40±29,43	
Celecoxib (µM)	CC_{20}	72,25±12,14	0,975	26,06±6,35	0,885	22,81±2,93	0,909
	CC_{50}	710,35±14,56		549,27±57,81		212,52±22,90	
	CC_{80}	1935,73±23,42		1322,49±191,08		1232,49±41,08	
Indometacina (µM)	CC_{20}	18,24±8,08	0,905	11,29±3,55	0,976	2,30±1,59	0,982
	CC_{50}	422,82±25,35		354,93±18,65		32,00±12,34	
	CC_{80}	1152,15±36,23		980,38±87,33		444,37±39,12	

Tabela 11. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, ácido poliáltico e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular L929 por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Substância \ Tempo		24h		72h		120h	
			R^2		R^2		R^2
Oleorresina de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	54,41±13,55	0,874	33,08±5,50	0,915	11,25±3,51	0,977
	CC_{50}	685,06±21,93		280,28±14,76		126,87±6,29	
	CC_{80}	8623,83±39,25		2374,31±24,24		1430,19±19,89	
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	41,75±14,93	0,980	27,66±2,23	0,995	21,49±4,06	0,892
	CC_{50}	503,70±19,49		226,77±16,90		167,40±9,40	
	CC_{80}	9226,45±37,65		1231,52±37,65		1012,88±12,27	
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	187,45±5,46	0,981	19,49±3,09	0,827	5,02±2,09	0,935
	CC_{50}	421,69±14,98		374,96±6,93		170,42±7,76	
	CC_{80}	9579,38±16,67		2213,10±16,13		1784,81±12,57	
Extrato das folhas de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	21,72±8,52	0,956	19,96±5,26	0,910	17,91±6,57	0,918
	CC_{50}	323,16±14,40		224,49±8,31		157,30±13,02	
	CC_{80}	5830,10±18,34		2524,53±12,96		1139,19±16,38	
Ácido poliáltico (µM)	CC_{20}	5,23±1,32	0,924	3,00±0,60	0,965	1,16±0,42	0,936
	CC_{50}	61,79±26,75		54,58±14,04		35,22±8,97	
	CC_{80}	3274,79±37,82		990,41±16,63		236,99±13,61	
Paclitaxel (nM)	CC_{20}	4,27±2,62	0,835	2,58±1,56	0,972	1,82±0,49	0,839
	CC_{50}	82,90±29,96		23,50±3,37		18,90±7,29	
	CC_{80}	331,66±35,32		302,86±36,50		183,57±15,53	
Camptotecina (nM)	CC_{20}	13,03±2,95	0,887	12,86±4,01	0,931	6,31±2,75	0,955
	CC_{50}	179,28±26,51		156,13±39,08		69,77±14,34	
	CC_{80}	5091,35±44,96		1870,81±65,28		378,50±42,45	
Celecoxib (µM)	CC_{20}	37,50±3,33	0,973	12,79±2,26	0,984	11,09±4,37	0,964
	CC_{50}	329,44±28,38		124,72±21,19		112,48±12,08	
	CC_{80}	2894,01±63,045		1216,00±75,11		1142,09±37,12	
Indometacina (µM)	CC_{20}	25,51±5,17	0,970	21,29±0,39	0,928	11,41±0,41	0,971
	CC_{50}	91,94±15,08		53,74±9,47		43,93±2,11	
	CC_{80}	331,61±36,18		222,60±18,30		136,80±40,50	

Na literatura podemos encontrar dados da atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares utilizando-se outras espécies de *Copaifera*. A oleorresina de *C. langsdorffii*, por exemplo não apresenta citotoxicidade frente à fibroblastos 3T3 de camundongos (MASSON-MEYERS et al., 2013a). Leandro e colaboradores (2012) em recente revisão publicada, descrevem as várias atividades farmacológicas atribuídas à oleorresina de *Copaifera*. Dentre elas podemos descrever a impotâncias de atividades citotóxicas frente à outros organismos, tais como atividade anti-leshimaniscida (SANTOS et al., 2008) e também atividade genotóxica *in vitro* e *in vivo* (CAVALCANTI et al., 2006). Essas atividades e as atividades citotóxicas descritas são atribuídas à presença de terpenos, tais como sesquiterpenos, e principalmente diterpenos ácidos, por exemplo, o ácido caurenoico e o ácido poliáltico. Neste estudo, também podemos notar que o ácido poliáltico, composto majoritário da oleorresina de *C. duckei* também foi submetido aos ensaios em células CHO-k1 e L929, possuindo atividade citotóxica mais pronunciada nos tempos de 72 e 120 horas, e resultando em CC_{50} relativamente altas, quando comparados a outras substâncias com potente atividade citotóxica – tais como o paclitaxel e a camptotecina, indicando que esta substância, em particular, apresenta certa tolerância tóxica.

Outro fato impotante apresentado neste estudo, atividade citotóxica de extratos das folhas de diferentes espécies de *Copaifera* atualmente não é amplamente discutido na literatura, onde foram encontrados uma carência de dados científicos. Sendo assim, podemos observar que as substâncias presentes nos extratos das folhas não apresentam efeitos citotóxicos pronunciados frente às linhagens não neoplásicas CHO-k1 e L929. Parte da ausência destes efeitos se deve ao fato de que estes extratos são compostos majoritariamente de substâncias fenólicas tais como flavonoides e derivados galoilquínicos (NOGUEIRA; FURTADO; BASTOS, 2015), que podem estar favorecendo mecanismos antioxidantes e citoprotetores (REMILA et al., 2015).

Apesar de não ser possível estabelecer uma relação direta entre os resultados descritos na literatura com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que os testes são realizados em diferentes condições e em diferentes linhagens celulares, com oleorresinas e folhas coletadas em diferentes regiões e sujeitas à efeitos sazonais, é importante que tais estudos sejam citados, para que de forma ampla, porém não conclusiva, se possa ter uma noção preliminar do potencial tóxico das oleorresinas e extratos de *Copaifera* spp.. É também importante destacar que o estudo realizado

neste trabalho é inédito, colaborando desta forma para a ampliação da biblioteca de informações a respeito das plantas do gênero *Copaifera*, uma vez que não existem estudos de citotoxicidade descritos na literatura avaliando a oleoresina e extratos de *C. oblongifolia* e *C. duckei*.

5.3.2 Efeitos tóxicos observados no teste de toxicologia aguda dose única *in vivo* – 14 dias e no teste de toxicidade sub-crônica doses repetidas *in vivo* – 90 dias

Como principal sinal clínico, os animais tratados com as doses de 1000 e 2000 mg/kg de oleorresina de *C. oblongifolia*, ou *C. duckei* apresentaram redução da atividade geral dos animais. Quatro horas após a administração da oleorresina de *C. oblongifolia*, houve melhora da letargia dos animais. A oleorresina de *C. duckei* apresentou toxicidade, pois 100% dos animais tratados morreram após 48 h na administração de 2000 mg/kg. Alterações na atividade geral e consciência dos animais podem ser indicativos de atividade no sistema nervoso central ou autônomo dos animais, indicando uma possível atividade sedativa, depressora ou miorrelaxante (KANJANAPOTHI et al., 2004).

No *screening* hipocrático os animais tratados com oleorresina de *C. duckei* apresentaram diminuição da resposta ao toque, do tônus corporal, da força de agarrar (astenia e ataxia). Acima de 12 h os animais apresentaram anorexia, hipnose, piloereção e cianose. Estes efeitos apresentados podem estar associados à presença de diterpenos ácidos, tais como o ácido poliáltico, uma vez que o mesmo apresenta atividades citotóxicas e hemolíticas, levando a morte de hemácias *in vitro* após 3 h de exposição (IZUMI et al., 2012). Outro exemplo é o ácido hardwickiico, presente em algumas oleorresinas de *Copaifera* spp. apresenta atividade sobre receptores dopaminérgicos e noradrenérgicos *in vitro*, e atuando também como agonistas em receptores opioides κ e δ, podendo justificar, em parte, os seus efeitos das oleorresinas sobre o sistema nervoso central (PITTALUGA et al., 2013). De acordo com a literatura, os diterpenos ácidos encontrados nas oleorresinas de *Copaifera* spp. tornam-se importantes moléculas na investigação de atividades farmacológicas para o tratamento de desordens do sistema nervoso central, tais como distúrbios de humor, drogas abuso, ansiedade, hipóxia e dor.

Porém, os efeitos tóxicos não foram observados na administração de ácido poliáltico isolado a partir de *C. duckei*, o que sugere que tais efeitos podem estar associados a outras substâncias, tais como os sesquiterpenos.

Como a oleorresina de *C. duckei* apresentou efeitos indicativos de toxicidade no teste agudo, esta foi testada à nível subcrônico, nas doses repetidas de 1, 10 e 100 mg/kg durante 90 dias. A oleorresina de *C. oblongifolia* não promoveu a morte dos animais no ensaio agudo, por este motivo, não foi testada à nível subcrônico. Durante a administração das diferentes doses de oleorresina de *C. duckei*, não foram observadas alterações no comportamento dos animais. Os animais tratados com extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* também não apresentaram comportamento indicativo de toxicidade. Todos os animais tratados foram mortos por aprofundamento da anestesia, sendo posteriormente submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca e as necrópsia para coleta dos órgãos e análise histopatológica. Em todos os grupos de animais tratados não houve diferenças estatísticas em ganho de peso ou consumo de água e ração quando comparados ao grupo controle.

Alterações no peso dos animais são um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade de um extrato ou substância (JAHN; GUNZEL, 1997).

Animais tratados com as maiores doses de oleorresina apresentaram um maior consumo de água quando comparados com os demais grupos e um menor consumo de ração (**Tabela 12** e **13**).

Tabela 12. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre o peso corporal, consumo de água e ração dos animais durante o teste de toxicidade aguda

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Média de peso corporal (g)		Variação de peso acumulado (%)		Média de consumo de água (mL/dia)		Média de consumo de ração (g/dia)	
		Machos	*Fêmeas*	*Machos*	*Fêmeas*	*Machos*	*Fêmeas*	*Machos*	*Fêmeas*
Controle	-	126.42±1.77	116.88±1.75	3.83±0.39	3.73±0.57	23.81±3.97	28.57±1.97	19.52±2.35	20.29±0.89
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	122.17±7.58	111.96±1.87	2.49±0.44	2.43±0.47	23.57±1.04	16.06±0.40	16.33±0.38	23.10±0.70
	2000	124.67±1.77	118.63±2.11	2.34±0.40	2.60±0.51	27.43±0.76	28.10±1.44	16.49±0.90	16.29±0.97
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	109.63±2.46	107.83±1.32	3.27±0.30	3.18±0.54	25.71±1.12	24.76±1.04	17.35±1.01	16.85±0.87
Oleorresina de *C. duckei*	1000	106.21±1.45	112.46±1.35	2.05±0.36	1.90±0.38	20.57±2.62	19.33±2.61	11.35±1.35	11.12±1.37
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	112.75±1.98	109.29±1.87	3.63±0.28	3.49±0.49	24.05±0.85	23.57±1.37	17.40±0.88	16.18±0.75
Ácido poliáltico	1000	116.17±1.60	115.88±2.11	2.98±0.57	2.90±0.84	25.71±3.84	24.05±3.84	18.67±0.78	23.00±3.00
	2000	115.58±1.54	111.33±2.15	2.97±0.29	2.84±0.39	25.48±3.19	23.33±3.17	18.33±0.76	22.14±1.62

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

Tabela 13. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre o peso corporal, consumo de água e ração dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Média de peso corporal (g)		Variação de peso acumulado (%)		Média de consumo de água (mL/dia)		Média de consumo de ração (g/dia)	
		Machos	*Fêmeas*	*Machos*	*Fêmeas*	*Machos*	*Fêmeas*	*Machos*	*Fêmeas*
Controle	-	126,42±1,77	116,88±1,75	0,55±0,34	0,73±0,29	30,95±4,33	57,38±7,98	19,76±3,09	25,14±6,52
Oleorresina de *C. duckei*	1	148,35±1,73	162,52±1,84	0,81±0,47	0,94±1,32	46,67±9,56	56,43±10,55	22,57±3,56	24,38±3,86
	10	139,87±0,89	154,23±2,89	0,45±0,33	0,97±0,33	32,62±4,22	30,71±2,30	15,76±1,42	19,81±2,70
	100	134,99±0,87	134,79±1,46	0,42±0,25	0,78±0,35	25,48±4,07	21,43±3,51	12,24±1,03	19,52±2,10

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

Do mesmo modo, não houve diferenças significativas no hemograma e no perfil bioquímico dos animais tratados com o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, confirmando assim, a segurança na administração destes extratos. O tratamento com a oleorresina parece não influenciar no número total de hemácias, porém pode-se observar um aumento da hemoglobina, do hematócrito, do volume corpuscular médio, da hemoglobina corpuscular média e da concentração de hemoglobina corpuscular média, tanto no ensaio agudo quanto no subcrônico (**Tabela 14** e **15**).

Nos animais tratados com as oleorresinas de *Copaifera* foram observadas plaquetopenia (trombocitopenia). As plaquetas são essenciais para a formação do tampão hemostático em resposta ao dano vascular. A trombocitopenia pode estar associada ao decréscimo na produção ou ao aumento da destruição, comum na quimioterapia intensa. A exposição a agentes tóxicos pode resultar em aumento da destruição de plaquetas mediadas por diversos mecanismos, interferindo em toda a cascata de coagulação (KLAASSEN, 2013).

Tabela 14. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre o hemograma (série vermelha) dos animais durante o teste de toxicidade aguda

Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série vermelha**								
Machos		**RBC (M/µL)**	**HGB (g/dL)**	**HCT (%)**	**VCM (fL)**	**HCM (pg)**	**CHCM (g/dL)**	**RDW (%)**	**PLT (K/µL)**	**VPM (fL)**
Controle	-	7.75±0.05	14.37±0.03	76.30±0.89	98.37±0.90	18.53±0.09	18.87±0.20	17.17±0.15	356.90±5.60	176.79±0.03
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	8.04±0.67	17.13±2.87	72.18±4.67	78.68±10.99	18.98±2.12	24.30±4.29	15.87±3.51	478.33±16.17	7.07±4.08
	2000	8.09±0.75	17.13±2.87	72.18±4.67	85.35±8.86	18.98±2.12	24.30±4.29	19.20±3.00	515.33±9.53	7.20±4.16
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	7.81±0.09	15.35±0.14	70.20±0.46	89.90±0.40	19.70±0.06	21.90±0.06	18.45±0.78	617.00±5.20	5.92±0.20
Oleorresina de *C. duckei*	1000	7.76±0.05	13.45±0.14	44.60±0.06	57.50±0.29	17.35±0.09	30.20±0.23	13.30±0.12	536.00±13.18	8.15±0.03
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	7.63±0.34	15.35±0.26	55.25±4.88	65.20±4.73	17.90±0.46	26.05±2.17	16.25±1.13	567.17±18.65	7.42±0.56
Ácido poliáltico	1000	7.67±0.16	15.83±0.35	76.83±1.31	100.27±0.91	20.67±0.13	20.63±0.12	17.13±0.38	528.33±19.72	6.30±0.20
	2000	7.69±0.03	14.17±0.13	76.13±0.66	98.97±1.02	18.43±0.18	18.63±0.13	17.93±0.52	627.00±25.11	5.77±0.16
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série vermelha**								
Fêmeas		**RBC (M/µL)**	**HGB (g/dL)**	**HCT (%)**	**VCM (fL)**	**HCM (pg)**	**CHCM (g/dL)**	**RDW (%)**	**PLT (K/µL)**	**VPM (fL)**
Controle	-	6.90±0.24	14.00±0.32	63.00±1.75	91.30±0.70	20.30±0.25	22.20±0.21	17.07±0.22	760.33±12.36	5.27±0.16
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	7.74±0.18	15.87±0.47	71.10±2.60	83.10±5.13	20.37±1.08	22.72±1.29	16.40±2.62	455.33±15.32	32.90±6.32
	2000	7.77±0.19	15.53±0.29	71.10±2.14	84.43±6.92	20.03±0.20	21.72±0.17	17.40±0.92	478.67±17.54	7.17±0.64
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	7.67±0.16	15.07±0.32	69.23±1.07	90.27±0.55	19.70±0.06	21.80±0.12	17.60±1.15	659.00±42.32	6.06±0.24
Oleorresina de *C. duckei*	1000	7.82±0.08	13.52±0.16	44.52±0.10	57.00±0.58	17.40±0.10	30.10±0.25	13.40±0.15	522.68±13.90	8.14±0.03
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	7.95±0.18	14.20±0.85	54.60±9.60	68.57±11.57	17.90±0.85	27.00±2.80	15.03±1.59	571.50±18.24	7.06±0.60
Ácido poliáltico	1000	7.66±0.16	15.70±0.41	76.65±1.43	99.90±0.08	20.50±0.08	20.50±0.16	17.20±0.08	463.50±7.76	6.00±0.16
	2000	7.12±0.22	13.63±0.42	72.63±1.58	93.63±9.38	46.53±17.23	18.77±0.26	17.90±0.57	576.67±13.92	5.38±0.15

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

Tabela 15. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre o hemograma (série vermelha) dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica

Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série vermelha**								
Machos		**RBC (M/µL)**	**HGB (g/dL)**	**HCT (%)**	**VCM (fL)**	**HCM (pg)**	**CHCM (g/dL)**	**RDW (%)**	**PLT (K/µL)**	**VPM (fL)**
Controle	-	7,17±0,24	17,15±1,78	35,77±7.33	59,47±0,72	30,97±6,46	51,30±9,62	18,77±0,12	477,67±50,54	6,70±0,15
Oleorresina de *C. duckei*	1	7,70±0,36	15,81±0,99	36,80±6,71	77,33±19,33	27,57±7,52	47,60±13,00	17,53±0,79	406,67±43,76	5,60±0,50
	10	7,33±0,06	15,10±0,26	43,23±0,28	58,97±0,41	20,63±0,33	35,00±0,40	19,37±0,71	403,67±52,72	4,35±0,25
	100	8,08±0,45	16,27±1,01	30,13±5,68	95,87±19,14	33,63±6,87	58,47±12,05	16,93±0,37	435,67±28,48	6,21±0,50
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série vermelha**								
Fêmeas		**RBC (M/µL)**	**HGB (g/dL)**	**HCT (%)**	**VCM (fL)**	**HCM (pg)**	**CHCM (g/dL)**	**RDW (%)**	**PLT (K/µL)**	**VPM (fL)**
Controle	-	7,41±0,18	15,30±0,35	76,67±1,70	103,33±0,33	20,60±0,06	19,97±0,09	18,73±0,52	578,67±84,33	5,99±0,48
Oleorresina de *C. duckei*	1	7,22±0,08	15,07±0,27	75,57±1,38	104,67±0,67	20,87±0,17	19,97±0,03	20,37±1,32	645,00±83,56	5,62±0,18
	10	6,63±0,05	13,90±0,26	60,00±9,92	105,67±0,67	21,03±0,32	19,90±0,40	17,40±0,71	736,67±60,63	4,81±0,17
	100	6,76±0,18	13,20±0,35	68,40±1,13	101,20±1,33	19,53±0,15	19,30±0,36	17,67±0,82	751,00±81,64	5,29±0,54

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

O aumento de todos os parâmetros hematológicos tais como hemácias e hemoglobina, pode ser caracterizado como policitemia. Neste quadro, o sangue torna-se mais viscoso, dificultando o transporte de oxigênio, reduzindo ao valor de 60% ou menos na corrente sanguínea. Podem ser causados por desidratação ou contração esplênica após estresse ou dor, resultando em injeção temporária de grande massa de eritrócitos na corrente sanguínea (JAIN, 1993).

O tratamento com a oleorresina e extrato de *C. oblongifolia* promove uma diminuição do número total de leucócitos, com aumento evidente de monócitos (**Tabela 16** e **17**). Quadros de leucopenia podem estar relacionados ao aumento do cortisol em situações de estresse fisiológico, podendo ser causado por uma liberação de catecolaminas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A monocitose transitória pode ser observada também em quadros inflamatórios agudos (JAIN, 1993).

Já o tratamento com oleorresina *C. duckei* promoveu aumento total de leucócitos com o tratamento de 1000 mg/kg. Após 24 h do tratamento com a oleorresina de *C. duckei* na dose de 2000 mg/kg houve grande aumento no número total de leucócitos, com grande neutrofilia, diminuição de linfócitos, monócitos e eosinófilos. O tratamento com o extrato das folhas de *C. duckei* manteve os valores de leucograma em níveis normais (**Tabela 16** e **17**).

Em condições fisiológicas, a atuação da adrenalina causando condições de estresse, medo, excitação ou exercício intenso podem aumentar o nível de leucócitos. Traumas, infecções bacterianas, corticoesteroides, doença inflamatória e intoxicações são as condições patológicas onde há aumento de leucócitos, principalmente os neutrófilos, geralmente acompanhado de desvio a esquerda (JAIN, 1993).

Tabela 16. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre o hemograma (série branca) dos animais durante o teste de toxicidade aguda

Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série Branca**					
Machos		**WBC (K/µL)**	**NEU (%)**	**LIN (%)**	**MONO (%)**	**EOS (%)**	**BASO (%)**
Controle	-	5.00±1.19	28.37±4.23	62.30±3.87	4.18±2.10	4.83±0.96	0.35±0.18
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	5.79±1.01	51.63±8.38	48.23±10.24	13.54±0.51	3.49±0.53	2.77±0.76
	2000	4.62±1.27	45.22±12.85	38.60±16.62	10.29±3.76	3.68±1.07	2.88±1.16
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	3.20±0.09	35.15±0.43	48.50±4.97	8.89±2.66	4.36±1.03	3.12±0.85
Oleorresina de *C. duckei*	1000	8.33±0.73	57.00±6.33	30.54±3.96	3.78±0.59	3.55±1.80	2.93±0.08
	2000	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	6.31±0.05	56.50±1.96	29.80±0.12	6.39±0.46	3.84±0.16	4.93±0.34
Ácido poliáltico	1000	4.26±0.50	26.37±3.55	52.57±2.26	12.53±0.98	4.48±0.63	4.09±1.60
	2000	4.13±0.45	37.43±3.51	49.37±0.98	6.64±2.51	5.25±1.04	1.28±1.15
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série Branca**					
Fêmeas		**WBC (K/µL)**	**NEU (%)**	**LIN (%)**	**MONO (%)**	**EOS (%)**	**BASO (%)**
Controle	-	7.30±1.96	52.83±18.43	39.17±17.50	4.05±1.30	2.57±1.25	1.38±0.24
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	5.07±1.16	44.30±7.28	51.57±6.79	13.54±0.51	4.49±0.73	3.44±0.78
	2000	4.92±1.14	45.30±12.78	38.23±16.28	10.20±3.85	3.49±1.09	2.77±1.25
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	3.53±0.35	35.87±0.84	47.63±5.04	7.97±2.82	6.18±2.09	2.35±1.15
Oleorresina de *C. duckei*	1000	7.75±0.43	57.70±6.29	29.55±3.84	3.79±0.59	3.08±1.73	2.91±0.08
	2000	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	6.67±0.99	52.47±4.49	31.13±1.34	8.01±1.21	5.73±2.32	2.68±1.52
Ácido poliáltico	1000	4.04±0.23	26.55±2.74	53.95±6.82	4.17±3.09	7.28±1.62	3.22±2.92
	2000	3.45±1.17	30.37±5.57	53.50±8.69	5.67±3.70	3.37±0.02	1.93±1.00

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

Tabela 17. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre o hemograma (série branca) dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica

Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série Branca**					
Machos		**WBC (K/µL)**	**NEU (%)**	**LIN (%)**	**MONO (%)**	**EOS (%)**	**BASO (%)**
Controle	-	5,51±0,76	29,53±6,00	63,97±6,97	5,96±2,14	0,22±0,07	0,30±0,07
Oleorresina de *C. duckei*	1	2,93±0,20	20,57±5,27	64,40±2,35	9,06±3,39	0,23±0,04	8,77±0,76
	10	5,52±0,29	33,03±1,59	57,67±6,28	2,79±2,49	0,07±0,05	0,12±0,05
	100	6,26±0,24	38,10±3,25	58,67±1,20	2,96±2,07	0,16±0,08	0,16±0,08
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Série Branca**					
Fêmeas		**WBC (K/µL)**	**NEU (%)**	**LIN (%)**	**MONO (%)**	**EOS (%)**	**BASO (%)**
Controle	-	5,58±0,25	40,13±2,60	50,17±2,49	4,83±1.02	3,90±2,58	0,14±0,00
Oleorresina de *C. duckei*	1	4,50±0,81	37,10±1,93	46,17±1,18	10,15±1,70	4,04±1,21	2,52±0,93
	10	5,60±1,68	39,07±5,26	48,77±6,19	5,73±1,70	3,58±0,87	2,83±1,99
	100	6,43±0,72	32,20±5,51	53,40±8,64	7,43±2,40	3,06±0,56	3,93±1.19

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

A oleorresina das espécies de *Copaifera* spp. apresentam compostos que promovem ações citotóxicas *in vitro* e *in vivo* (ABRÃO et al., 2015; LIMA et al., 2003b; MAISTRO et al., 2005; SACHETTI et al., 2009, 2011; VARGAS et al., 2015). Estes efeitos citotóxicos podem ser observados *in vivo,* como resultado do estresse fisiológico nos animais, contribuindo para a progressão do quadro toxicológico.

As alterações nos parâmetros bioquímicos observados foram o aumento dos níveis de glicose, colesterol, triglicerídeos, ureia, AST e ALT com a administração da oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei.* A dose de 2000 mg/kg de oleorresina de *C. duckei* diminuiu os níveis de glicose, colesterol, triglicerídeos, ureia, creatinina, AST e ALT e γ-GT (**Tabela 18** e **19**). As anormalidades detectadas nas atividades séricas das enzimas hepáticas e marcadores renais são consideradas indicadores sensíveis de perturbações hepáticas, pancreáticas e renais. Elevações nas atividades séricas enzimáticas podem dever-se a alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, indução de enzimas microssomais ou lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular.

Tabela 18. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos dos animais durante o teste de toxicidade aguda

Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Parâmetros bioquímicos**							
Machos		**Glicose (mg/dL)**	**Colesterol (mg/dL)**	**Triglicerídeos (mg/dL)**	**Ureia (mg/dL)**	**Creatinina (mg/dL)**	**AST (TGO) (U/L)**	**ALT (TGP) (U/L)**	**GamaGT (U/L)**
Controle	-	124.00±8.72	58.67±1.33	81.33±5.81	52.00±2.31	0.27±0.07	61.33±10.97	64.67±5.70	12.00±2.31
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	282.33±13.67	118.00±11.02	118.33±6.49	55.33±1.76	0.31±0.05	60.67±2.67	61.33±11.57	14.00±1.15
	2000	264.00±12.17	111.33±13.38	139.00±16.26	58.00±1.15	0.33±0.07	67.00±4.73	87.33±25.44	12.33±3.18
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	182.00±6.93	77.00±1.73	96.00±10.39	55.00±0.58	0.20±0.00	55.00±5.20	81.00±10.97	17.00±0.58
Oleorresina de *C. duckei*	1000	250.00±2.31	99.00±4.04	129.00±16.74	57.00±2.89	0.20±0.00	63.00±6.35	91.00±6.35	9.00±0.58
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	169.00±4.04	59.00±9.81	109.00±24.83	45.00±7.51	0.30±0.06	51.00±12.12	53.00±7.51	13.00±0.58
Ácido poliáltico	1000	222.67±15.44*	74.00±5.03	96.67±11.57	54.67±3.71	0.20±0.00	39.33±5.33	54.67±7.06	10.67±1.33
	2000	262.67±16.75*	148.67±17.14*	216.00±14.85*	78.67±8.19	0.27±0.07	145.33±4.06*	119.00±9.16*	12.00±1.15
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Parâmetros bioquímicos**							
Fêmeas		**Glicose (mg/dL)**	**Colesterol (mg/dL)**	**Triglicerídeos (mg/dL)**	**Ureia (mg/dL)**	**Creatinina (mg/dL)**	**AST (TGO) (U/L)**	**ALT (TGP) (U/L)**	**GamaGT (U/L)**
Controle	-	130.00±12.49	62.00±9.02	40.67±4.67	42.33±0.33	0.20±0.00	50.00±8.33	68.67±2.91	13.33±0.67
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	268.67±15.10	118.00±17.93	127.00±10.54	54.67±5.46	0.33±0.07	64.33±5.49	86.00±24.58	11.67±2.96
	2000	282.00±10.58	108.00±15.53	120.67±3.71	54.67±4.37	0.33±0.07	66.67±4.67	84.67±15.50	11.33±2.91
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	133.33±13.28	81.33±4.67	114.67±9.40	60.67±5.70	0.27±0.07	55.33±5.21	81.33±10.97	17.33±0.67
Oleorresina de *C. duckei*	1000	244.00±6.43	82.67±16.83	123.67±17.57	58.00±3.06	0.20±0.00	64.67±6.57	93.00±6.66	9.00±0.58
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	168.67±4.06	100.00±9.28	125.33±13.72	48.00±8.08	0.33±0.07	56.67±13.38	50.00±8.08	12.67±0.67
Ácido poliáltico	1000	190.67±13.13	69.33±8.74	110.00±9.08	56.67±7.69	0.12±0.01	35.33±1.33	58.00±3.06	11.33±1.33
	2000	235.00±9.85*	266.67±7.88*	380.67±13.97*	72.33±7.54	0.27±0.07	145.00±5.69*	126.33±14.40*	16.00±2.00

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações com o grupo controle.

Tabela 19. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre os parâmetros bioquímicos dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Parâmetros bioquímicos							
Machos		Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (TGO) (U/L)	ALT (TGP) (U/L)	GamaGT (U/L)
Controle	-	168,00±10,26	78,67±5,93	85,33±13,38	64,67±2,67	0,27±0,07	84,67±13,48	69,33±2,91	8,00±1,15
Oleorresina de *C. duckei*	1	140,67±47,11	76,00±4,00	89,33±21,67	43,33±6,96	0,20±0,00	64,00±21,20	48,00±5,77	5,33±0,67
	10	158,00±9,45	61,33±3,53	44,67±8,74	47,33±2,40	0,20±0,00	85,00±7,00	80,00±14,00	6,00±1,15
	100	136,00±19,29	69,33±6,36	44,67±5,46	48,00±0,00	0,47±0,07	102,00±8,00*	52,00±1,15	6,67±0,67
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Parâmetros bioquímicos**							
Fêmeas		Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (TGO) (U/L)	ALT (TGP) (U/L)	GamaGT (U/L)
Controle	-	199,33±17,02	80,00±9,87	116,00±20,00	62,67±3,71	0,27±0,07	195,00±15,00	62,00±6,43	8,00±1,15
Oleorresina de *C. duckei*	1	175,33±13,97	73,33±3,53	133,33±4,06	56,67±6,77	0,27±0,07	85,00±33,00	68,00±7,02	9,33±0,67
	10	197,00±33,00	68,00±10,00	114,00±46,00	73,00±7,00	0,40±0,00	73,00±11,00	71,00±5,00	10,00±2,00
	100	157,33±16,34	64,00±9,17	59,00±1,00	61,33±2,40	0,20±0,00	141,33±7,69*	61,33±3,33	8,67±0,67

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

A redução ou aumento do peso dos órgãos internos é um índice simples e sensível indicativo de toxicidade após exposição, e muitas vezes, são efeitos associados ao tratamento (SELLERS et al., 2007; TEO et al., 2002).

Neste trabalho, o tratamento as oleorresinas e extratos de *Copaifera* spp. não induziram mudanças significativas no peso relativo dos órgãos dos *hamsters* de ambos os sexos, com excessão dos rins, fígado e pâncreas.

O aspecto visual do fígado é compatível com a presença de esteatose. No pâncreas as não foram evidenciadas lesões levam à pancreatite, porém observa-se o aumento do peso do órgão, sugerindo edema e possível lesão microscópica. Nos rins, a nefrotoxicidade é acompanhada pelo aumento dos níveis de creatinina e glicose, os quais foram observados nos exames bioquímicos. Diversos processos toxicológicos envolvendo o fígado, o pâncreas e os rins podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas e marcadores, devido à variação na distribuição de cada um no organismo (SHIRWAIKAR; KHAN; MALINI, 2003). Entretanto, o aumento destes parâmetros bioquímicos aponta para uma possível sobrecarga hepática, pancreática e renal, as quais devem ser investigadas mais detalhadamente através da observação de lâminas histológicas (**Tabela 20** e **21**).

Com relação à análise histológica dos órgãos alterados, em geral, as estruturas funcionais apresentam aspecto normal, porém com intenso infiltrado inflamatório, com presença de células polimorfonucleares (**Tabela 22**). Essas alterações são apresentadas tanto em animais submetidos ao teste de toxicidade aguda com uma única dose, quanto aos animais submetidos ao teste de toxicidade subcrônica com doses repetidas em 90 dias, e nas duas doses testadas, sugerindo que são alterações que não dependem da e dose-tempo. As alterações histológicas no fígado podem sustentar as alterações bioquímicas observadas para AST e ALT em animais que receberam a oleorresina.

A metabolização de terpenos pode resultar em substâncias potencialmente nocivas, tais como compostos oxigenados (SCHMIDT; BELOV; GÖEN, 2013) para o funcionamento mitocondrial, estimulando reações imunológicas específicas (PADUCH et al., 2007). O dano hepático pode ser resultado do metabolismo de fase 1, com a participação enzimática do CYP_{450}, e o metabolismo de conjugação (fase 2) (ARIYOSHI et al., 1975; AUSTIN et al., 1988; VIGUSHIN et al., 1998). Além disso, o aumento da atividade da CYP_{450} pode resultar em espécies reativas de oxigênio, que

danificam os mecanismos de respiração mitocondrial e a produção de ATP, inibindo a β-oxidação e resultando em esteatose (ARIYOSHI et al., 1975; AUSTIN et al., 1988).

A esteatose foi observada nos animais tratados com oleorresina de *C. duckei*, sugerindo que as alterações histológicas com presença de células inflamatórias, principalmente no parênquima hepático, sugerem danos hepáticos rimários, isto é, predispõe a formação de necrose ou apoptose mediada por respostas imunológicas específicas, com possível participação de linfócitos T citotóxicos, embora estas células não estejam presentes nos cortes histológicos (WU et al., 2012; YEH; BRUNT, 2007).

O aumento do peso do fígado pode ser decorrente ao aumento do volume celular, associada à formação de microvacuólos ou espaços citoplasmáticos em resposta à ação dos produtos do metabolismo dos terpenos, resultando em acúmulo de sódio e do teor de água (KOSIF et al., 2010).

Vale ressaltar que a dose tóxica letal é acima de 1000 mg/kg em dose única, e o perfil tóxico foi observado em animais repetidamente tratados com 100mg/kg. Tais resultados tóxicos encontrados não podem ser relevantes para os seres humanos, considerando-se apenas as doses utilizadas em animais, uma vez que a superfície corporal de um humano representa aproximadamente 100 vezes maior que a superfície corporal de um *hamster* (KLAASSEN, 2013). Na prática, a exposição humana à produtos, cosméticos ou fitoterápicos, contendo a oleorresina de *Copaifera* spp. não seria o suficiente para produzir lesão hepática, renal ou pancreática.

Tabela 20. Efeitos da administração oral da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, do ácido poliático (1000 e 2000 mg/kg) sobre a proporção dos órgãos dos animais durante o teste de toxicidade aguda

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Proporção do peso dos órgãos em relação ao peso corporal									
Machos		Coração (%)	Pulmões (%)	Rins (%)	Fígado (%)	Adrenal (%)	Estômago (%)	Pâncreas (%)	Bexiga (%)	Intestinos (%)	Testículos (%)
Controle	-	0.28±0.15	0.65±0.02	0.86±0.06	3.19±0.06	0.08±0.02	2.57±0.23	0.13±0.03	0.23±0.06	9.25±0.29	0.43±0.18
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	0.26±0.03	0.58±0.03	0.76±0.02	4.02±0.17	0.04±0.00	0.77±0.00	0.29±0.00	0.13±0.01	9.64±0.63	0.21±0.02
	2000	0.28±0.01	0.64±0.09	0.73±0.04	4.38±0.45	0.04±0.00	0.74±0.01	0.29±0.02	0.14±0.01	10.73±0.08	0.23±0.00
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	0.44±0.04	0.78±0.03	1.05±0.24	3.86±0.50	0.08±0.00	0.86±0.00	0.24±0.00	0.16±0.00	12.09±0.06	0.17±0.00
Oleorresina de *C. duckei*	1000	0.43±0.03	0.48±0.05	1.25±0.30	6.19±0.34	0.08±0.00	1.46±0.10	0.41±0.05*	0.24±0.00	11.35±0.46	0.24±0.01
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	0.45±0.05	0.76±0.03	0.95±0.19	3.76±0.49	0.07±0.00	1.12±0.16	0.21±0.03	0.25±0.00	11.76±0.06	0.15±0.01
Ácido poliáltico	1000	0.40±0.03	0.66±0.01	1.02±0.03	3.67±0.18	0.05±0.01	1.15±0.29	0.13±0.00	0.16±0.01	10.31±1.04	0.40±0.13
	2000	0.33±0.14	0.83±0.11	1.14±0.09*	5.72±1.02*	0.06±0.00	1.43±0.33	0.24±0.01*	0.84±0.65	13.90±0.47	0.26±0.01
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Proporção do peso dos órgãos em relação ao peso corporal**									
Fêmeas		Coração (%)	Pulmões (%)	Rins (%)	Fígado (%)	Adrenal (%)	Estômago (%)	Pâncreas (%)	Bexiga (%)	Intestinos (%)	Ovários (%)
Controle	-	0.33±0.01	0.59±0.06	0.82±0.05	3.32±0.30	0.04±0.01	0.72±0.02	0.19±0.03	0.13±0.01	7.42±0.05	0.07±0.00
Oleorresina de *C. oblongifolia*	1000	0.36±0.01	0.61±0.05	0.78±0.03	3.21±0.11	0.06±0.01	0.71±0.03	0.10±0.01	0.11±0.01	6.96±0.42	0.09±0.00
	2000	0.36±0.02	0.64±0.06	0.88±0.05	3.47±0.30	0.07±0.01	0.77±0.02	0.22±0.03	0.16±0.01	7.70±0.05	0.10±0.00
Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	2000	0.44±0.02	0.76±0.03	0.99±0.06	3.99±0.25	0.11±0.01	0.86±0.00	0.21±0.03	0.18±0.01	8.67±0.04	0.11±0.00
Oleorresina de *C. duckei*	1000	0.45±0.01	0.69±0.03	1.19±0.07	4.75±0.23	0.08±0.00	0.97±0.06	0.44±0.03	0.27±0.01	10.29±0.88	0.10±0.00
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato das folhas de *C. duckei*	2000	0.43±0.01	0.74±0.04	0.96±0.07	3.88±0.26	0.11±0.01	0.84±0.02	0.20±0.05	0.17±0.02	8.43±0.04	0.10±0.01
Ácido poliáltico	1000	0.25±0.11	0.71±0.03	0.94±0.06	3.29±0.09	0.06±0.02	1.66±0.25	0.12±0.01	0.14±0.06	11.10±1.50	0.08±0.01
	2000	0.58±0.02	0.97±0.03	1.25±0.05*	4.92±0.25*	0.04±0.00	1.05±0.27	0.25±0.03*	0.25±0.09	12.93±1.20	0.12±0.03

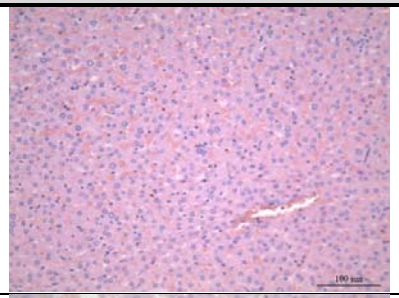
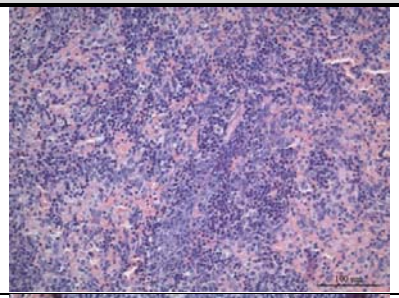
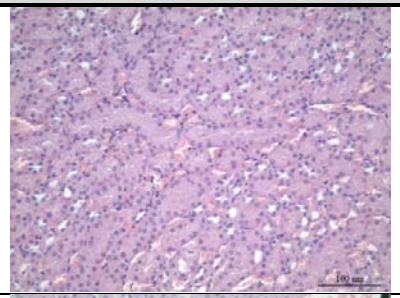
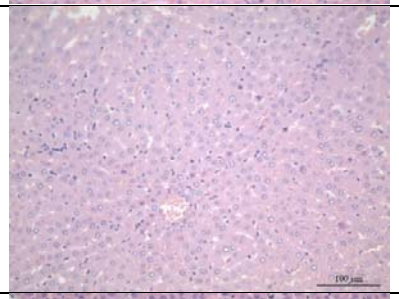
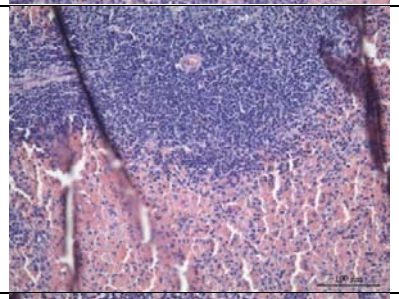
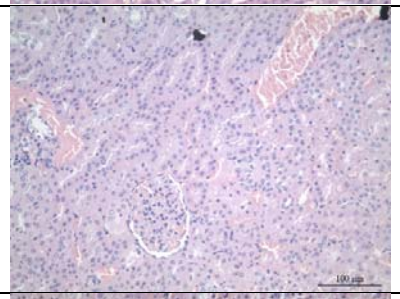
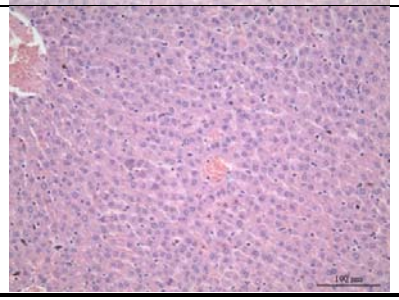
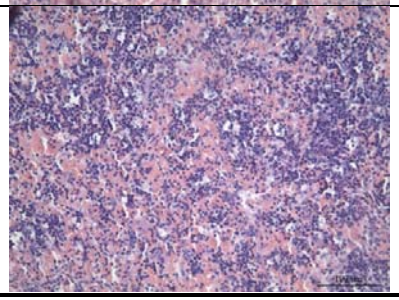
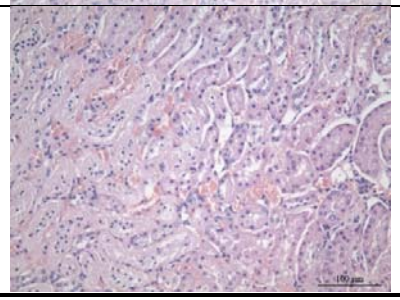
Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). As proporções do peso dos órgãos em relação ao peso corporal foram calculadas como: (peso do órgão/peso terminal do corpo) x 100 e expressas como porcentagem do peso do órgão. Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações.

Tabela 21. Efeitos da administração oral da oleorresina de *C. duckei* (1, 10 e 100 mg/kg) sobre a proporção dos órgãos dos animais durante o teste de toxicidade subcrônica

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Proporção do peso dos órgãos em relação ao peso corporal									
Machos		Coração (%)	Pulmões (%)	Rins (%)	Fígado (%)	Adrenal (%)	Estômago (%)	Pâncreas (%)	Bexiga (%)	Intestinos (%)	Testículos (%)
Controle	-	0,36±0,01	0,57±0,01	0,80±0,05	3,01±0,14	0,06±0,01	2,17±0,20	0,12±0,03	0,16±0,02	8,85±0,91	0,62±0,04
Oleorresina de *C. duckei*	1	0,37±0,04	0,58±0,04	0,77±0,11	3,16±0,33	0,05±0,01	1,63±0,47	0,17±0,04	0,15±0,04	8,22±1,64	0,63±0,10
	10	0,38±0,02	0,58±0,05	0,80±0,03	3,07±0,10	0,05±0,01	1,59±0,12	0,11±0,02	0,15±0,01	6,48±0,73	0,48±0,11
	100	0,38±0,04	0,70±0,14	0,83±0,04	3,19±0,28	0,06±0,02	1,80±0,02	0,11±0,01	0,17±0,04	7,75±0,39	0,46±0,10
Tratamento v.o.	**Dose (mg/kg)**	**Proporção do peso dos órgãos em relação ao peso corporal**									
Fêmeas		Coração (%)	Pulmões (%)	Rins (%)	Fígado (%)	Adrenal (%)	Estômago (%)	Pâncreas (%)	Bexiga (%)	Intestinos (%)	Ovários (%)
Controle	-	0,44±0,01	0,87±0,04	1,07±0,08	4,17±0,46	0,04±0,00	3,04±0,09	0,17±0,00	0,14±0,01	12,60±1,29	0,08±0,01
Oleorresina de *C. duckei*	1	0,33±0,02	0,61±0,06	0,80±0,04	3,28±0,05	0,04±0,00	2,52±0,52	0,18±0,01	0,12±0,03	9,30±1,31	0,05±0,02
	10	0,43±0,04	0,79±0,04	1,02±0,03	3,68±0,98	0,04±0,00	3,15±0,40	0,21±0,04	0,14±0,04	13,10±0,99	0,09±0,01
	100	0,34±0,00	0,74±0,05	0,76±0,07	2,89±0,26	0,03±0,01	2,18±0,25	0,15±0,03	0,11±0,02	9,54±0,74	0,08±0,03

Os dados representam a média±E.P.M. (n=5). As proporções do peso dos órgãos em relação ao peso corporal foram calculadas como: (peso do órgão/peso terminal do corpo) x 100 e expressas como porcentagem do peso do órgão. Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações com o grupo controle.

Tabela 22. Detalhes de cortes histológicos do fígado, pâncreas e rins após a administração oral da oleorresina de *C. oblongifolia* (2000 mg/kg) e *C. duckei* (1000 mg/kg).

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Fígado Corte transversal em aumento de 400x	Pâncreas Corte transversal em aumento de 400x	Rim Corte transversal em aumento de 400x
Controle	-			
Oleorresina de *C. oblongifolia*	2000			
Oleorresina de *C. duckei*	1000			

5.4 Avaliação da atividade gastroprotetora

5.4.1 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. sobre células AGS e sobre o ensaio curativo *in vitro* em células L929

A linhagem neoplásica de adenocarcinoma gástrico (AGS) é uma célula neoplásica derivada de indivíduo de 54 anos, feminino, caucasiano, sem tratamento prévio anti-câncer (BARRANCO et al., 1983a, 1983b), e mostrou-se mais sensível ao tratamento com a oleorresina, extratos de folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. quando comparadas as linhagens não-neoplásicas. O tratamento destas células diminuiu a viabilidade celular pelo método de fosfatase ácida de maneira dose-tempo-dependente (**Tabela 23**).

Tabela 23. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular AGS por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Substância \ Tempo		24h	R^2	72h	R^2	120h	R^2
Oleorresina de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	31,68±1,20	0,996	11,98±1,44	0,995	5,58±0,45	0,991
	CC_{50}	43,56±3,02		28,94±2,19		20,04±0,50	
	CC_{80}	69,90±8,68		59,90±7,18		34,68±1,15	
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	32,76±1,30	0,995	19,91±2,41	0,961	15,52±1,50	0,978
	CC_{50}	59,57±2,84		59,57±1,62		43,93±2,74	
	CC_{80}	178,26±4,57		124,40±8,37		108,33±3,88	
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	63,36±7,91	0,993	31,64±2,59	0,999	7,70±1,39	0,991
	CC_{50}	42,81±3,15		41,89±4,59		31,49±5,62	
	CC_{80}	32,08±1,01		57,12±7,33		54,41±9,26	
Extrato das folhas de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	81,28±6,05	0,993	37,26±1,38	0,964	16,02±1,17	0,996
	CC_{50}	120,03±7,20		77,98±8,68		65,15±1,54	
	CC_{80}	177,25±6,03		113,93±3,32		101,78±12,08	
Paclitaxel (nM)	CC_{20}	14,49±2,02	0,969	0,80±1,95	0,998	0,66±0,36	0,978
	CC_{50}	63,71±2,84		59,49±2,62		11,64±0,75	
	CC_{80}	578,02±8,32		274,97±8,60		337,03±4,18	
Camptotecina (nM)	CC_{20}	6,38±2,82	0,990	3,82±1,29	0,985	0,81±1,63	0,996
	CC_{50}	27,81±4,79		8,45±3,96		2,87±0,74	
	CC_{80}	46,91±8,67		34,95±6,61		7,01±0,30	

A atividade citotóxica foi confirmada através da determinação do percentual de células vivas e mortas por citometria de fluxo marcadas com iodeto de propídio (**Tabela 24**) (PICK et al., 2004). Podemos observar que a oleorresina de ambas as espécies de *Copaifera* apresentam maior potencial citotóxico quando comparado ao extrato das folhas, colaborando para os resultados descritos no teste de citotoxicidade.

Tabela 24. Valores de porcentagem de células vivas e mortas para o branco (sem adição de PI), controle, DMSO 2%, a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de determinação de morte celular por iodeto de propídio por citometria de fluxo em linhagem celular AGS (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Tempo / Substância		24h		72h		120h	
	Conc.	Células vivas	Células mortas	Células vivas	Células mortas	Células vivas	Células mortas
Branco	-	94,13±1,08	4,72±2,74	90,52±4,83	15,48±1,26	83,47±5,45	11,70±2,31
Controle	-	82,83±8,28	17,95±6,74	67,18±7,37	29,22±5,95	68,34±4,86	32,62±1,98
DMSO 2%	-	68,17±16,95	27,96±15,79	73,44±1,98	22,35±1,62	53,07±2,86	39,38±1,83
Oleorresina de *C. oblongifolia* (µg/mL)	10	58,94±11,72	36,47±11,15	77,70±2,30	19,10±1,74	45,36±5,22	48,20±7,26
	30	51,34±6,16	42,24±5,68	60,33±2,52	34,65±2,14	22,06±6,01	73,74±6,36
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	10	55,62±10,41	39,51±10,16	70,12±5,87	26,25±6,38	27,17±10,12	68,51±10,08
	30	66,20±21,36	30,16±20,22	65,37±7,15	30,93±6,80	37,43±10,05	55,61±11,33
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	10	67,71±13,09	28,53±12,39	75,34±3,08	20,55±3,11	40,40±3,87	52,39±5,21
	30	72,39±9,42	23,50±7,49	70,09±3,73	25,89±3,20	27,17±10,12	68,51±10,08
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	10	60,89±8,82	34,54±8,38	77,19±2,90	19,79±2,86	26,32±15,65	70,71±16,13
	30	58,50±18,38	36,69±17,50	71,52 ±1,60	25,54±1,49	21,92±13,46	74,74±14,17
Extrato das folhas de *C. duckei* (µg/mL)	10	55,62±10,41	39,51±10,16	70,12±5,87	26,25±6,38	27,27±9,08	69,20±10,21
	30	66,20±21,36	30,16±20,22	65,37±7,15	30,93±6,80	22,06±6,01	73,74±6,36
Paclitaxel (nM)	10	54,14±29,39	40,97±27,06	25,28±8,70	71,36±8,65	8,30±4,64	85,71±3,70
	50	49,25±27,69	47,14±26,75	13,95±3,56	83,60±4,15	6,15±1,69	85,69±4,74
Camptotecina (nM)	10	58,57±20,10	38,64±19,03	42,51±2,84	53,47±2,25	9,79±1,95	85,56±1,25
	50	38,51±3,59	58,38±3,82	33,86±5,93	63,25±6,14	6,73±1,48	89,20±3,02

Com base nos resultados nas linhagens CHO-K1 e L929, parece haver principalmente para as oleorresinas, uma especificade maior para células que apresentam metabolismo tumoral. As oleorresinas de *Copaifera* spp. são descritas quimicamente como uma solução de ácidos diterpênicos em um óleo essencial, contendo grandes quantidades de sesquiterpenos (BRAGA et al., 1998; CASCON; GILBERT, 2000). Em recente revisão Greay e Hammer (2011) demonstraram a importância de estudos para estabelecer os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral. Existem diversos relatos na literatura demonstrando, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o potencial de terpenos para o tratamento de câncer, onde tais substâncias parecem induzir a apoptose, modular a atividade de caspases e aumentar o infiltrado leucocitário no tumor (GREAY; HAMMER, 2011; LIMA et al., 2003b; PETIWALA; JOHNSON, 2015; RUSSO et al., 2015).

Além disso, os ácidos galoilquínicos isolados, ácido gálico e ácido quínico, e controles positivos paclitaxel e camptotecina foram testadas quanto à citotoxicidade em células de adenocarcinoma gástrico (AGS). Todos os tratamentos exibiram atividade citotóxica numa dose e dependente do tempo do efeito (**Tabela 25**).

Flavonóides, taninos condensados, e ácidos galoilquínicos levar a uma diminuição da incidência do câncer, especialmente pela redução espécies reativas de oxigênio, potente atividade anti-inflamatória, e melhorar a terapia anti-*Helicobacter pylori*, que está associada com o aparecimento de adenocarcinoma gástrico (FANTINI et al., 2015; FRESCO et al., 2010; YAHIRO et al., 2005; YANG; LEE; YEN, 2000).

As substâncias, tais como o ácido gálico e ácido quínico, apresentam potentes atividades citotóxicas em células neoplásicas, por exemplo, contra células das linhagens THP-1 e HeLa (REMILA et al., 2015; SANCHES et al., 2015). As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel na transdução de sinal entre as células cancerosas, a transcrição e produção de citocinas pró-inflamatórias (REMILA et al., 2015) tais como do NF-κB. Os compostos fenólicos, como os ácidos galoilquínicos presentes apresentam promissoras atividades antioxidantes (COSTA-MACHADO et al., 2015) e podem agir sobre os mecanismos que reduzam essas espécies reativas e, consequentemente, contribuir para a terapia antitumoral.

Substâncias que exibem atividades anti-tumorais que, em combinação também possuam atividades antioxidantes pode melhorar a eficácia no tratamento e promover a cura na terapia anti-tumoral, em comparação com apenas substâncias que apresentam apenas atividades citotóxicas. Além de inibir a carcinogênese, estas

substâncias podem prevenir o dano e morte celular de células saudáveis, reduzindo assim os efeitos secundários da quimioterapia (FANTINI et al., 2015; OOI et al., 2011).

Tabela 25. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para o ácido gálico, ácido quínico, os 16 ácidos galoílquinicos derivados de *Copaifera* spp. , e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular AGS por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas)

Substância \ Tempo		24h		72h		120h	
			R^2		R^2		R^2
Ácido gálico (µM)	CC_{20}	2,31±0,63	0,986	1,42±0,35	0,963	0,75±0,34	0,989
	CC_{50}	4,68±0,90		2,95±0,44		2,33±0,67	
	CC_{80}	9,49±2,92		7,21±3,50		6,12±1,58	
Ácido quínico (µM)	CC_{20}	1,24±0,50	0,987	0,77±0,30	0,950	0,49±0,16	0,916
	CC_{50}	3,85±0,99		2,29±0,56		1,77±0,35	
	CC_{80}	11,92±5,49		7,67±2,80		6,36±2,17	
Ácido 3-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(1)** (µM)	CC_{20}	8,42±1,45	0,952	4,19±1,69	0,989	2,88±1,21	0,989
	CC_{50}	15,79±1,88		9,87±2,39		8,27±2,17	
	CC_{80}	29,62±5,52		23,76±10,14		23,23±9,17	
Ácido 3,5-di-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(2)** (µM)	CC_{20}	5,87±2,51	0,979	4,12±1,45	0,902	2,97±1,35	0,982
	CC_{50}	14,96±3,92		12,13±2,61		8,85±2,50	
	CC_{80}	38,08±17,65		35,73±13,51		26,35±12,34	
Ácido 3-*O*-(galoil)-4-*O*-(3-*O*- metil galoil)-quínico **(3)** (µM)	CC_{20}	7,63±1,80	0,919	5,02±1,61	0,917	3,31±1,44	0,988
	CC_{50}	15,14±2,36		10,77±2,06		8,84±2,36	
	CC_{80}	30,05±7,60		23,55±10,19		23,12±7,38	
Ácido 3,5-di-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(4)** (µM)	CC_{20}	8,53±2,15	0,989	4,81±1,35	0,934	3,18±1,35	0,989
	CC_{50}	17,09±2,81		11,57±1,98		9,23±2,41	
	CC_{80}	34,25±8,97		27,81±7,96		26,78±11,63	
Ácido 3-*O*-(galoil)-5-*O*-(3-*O*- metil galoil)-quínico **(5)** (µM)	CC_{20}	8,05±1,89	0,917	3,97±1,45	0,904	3,22±1,41	0,988
	CC_{50}	16,46±2,51		10,24±2,28		8,69±2,35	
	CC_{80}	33,66±8,32		26,37±9,71		23,50±10,27	
Ácido 3-*O*-(3-*O*-metil galoil)-5-*O*-(galoil)-quínico **(6)** (µM)	CC_{20}	7,11±2,31	0,985	3,14±1,18	0,912	2,31±1,37	0,980
	CC_{50}	14,42±3,04		8,23±1,91		7,91±2,94	
	CC_{80}	29,25±10,18		27,10±17,01		21,56±7,99	
Ácido 4,5-di-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(7)** (µM)	CC_{20}	5,14±1,96	0,986	3,58±1,12	0,929	3,05±1,26	0,900
	CC_{50}	14,21±3,32		10,79±2,07		9,10±2,31	
	CC_{80}	39,25±16,43		32,49±10,76		27,08±11,47	
Ácido 3-*O*-(3-*O*-metil galoil)-4-*O*-(galoil)-quínico **(8)** (µM)	CC_{20}	7,43±2,18	0,987	3,11±1,19	0,907	2,97±1,42	0,986
	CC_{50}	15,96±2,98		9,44±2,51		8,31±1,96	
	CC_{80}	34,25±10,66		27,97±11,63		22,17±8,40	

Ácido 3,4-di-*O*-galoil-quínico **(9)** (µM)	CC_{20}	7,97±2,37	0,986	3,21±1,45	0,986	2,21±1,12	0,968
	CC_{50}	16,90±3,20		9,45±2,63		7,70±2,44	
	CC_{80}	35,84±11,23		27,76±12,95		26,80±14,36	
Ácido 3,5-di-*O*-galoil-quínico **(10)** (µM)	CC_{20}	8,67±2,01	0,917	5,46±1,96	0,984	1,74±0,98	0,989
	CC_{50}	17,05±2,61		10,79±2,25		6,89±2,43	
	CC_{80}	33,51±8,08		27,36±4,12		21,32±7,71	
Ácido 3-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(11)** (µM)	CC_{20}	6,94±2,47	0,983	4,53±1,38	0,930	3,32±1,49	0,987
	CC_{50}	16,17±3,58		11,53±2,14		9,311±2,57	
	CC_{80}	37,67±14,43		29,34±9,19		26,05±11,87	
Ácido 4-*O*-(galoil)-5-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(12)** (µM)	CC_{20}	3,12±1,70	0,979	3,64±1,69	0,985	2,61±1,29	0,986
	CC_{50}	12,76±4,42		9,99±2,84		8,10±2,49	
	CC_{80}	52,11±34,64		27,36±12,96		25,12±12,79	
Ácido 4,5-di-*O*-galoil-quínico **(13)** (µM)	CC_{20}	8,42±2,02	0,908	3,12±1,74	0,988	1,62±0,81	0,980
	CC_{50}	17,33±2,68		9,09±3,13		6,30±1,98	
	CC_{80}	35,68±8,94		26,45±15,12		24,49±13,05	
Ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(14)** (µM)	CC_{20}	3,86±1,97	0,980	5,80±1,68	0,924	2,73±1,12	0,907
	CC_{50}	12,87±4,07		11,70±2,05		7,94±2,03	
	CC_{80}	42,86±24,89		23,60±7,12		23,12±9,63	
Ácido 3,5-di-*O*-(galoil)-4-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(15)** (µM)	CC_{20}	6,25±2,53	0,981	4,16±1,45	0,910	2,77±1,22	0,988
	CC_{50}	15,94±3,97		10,29±2,17		8,09±2,21	
	CC_{80}	40,63±18,12		25,46±8,87		23,61±10,53	
Ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil-quínico **(16)** (µM)	CC_{20}	2,69±1,93	0,965	6,58±1,88	0,903	2,49±1,21	0,986
	CC_{50}	13,43±6,30		12,41±2,24		7,67±2,33	
	CC_{80}	66,89±16,02		43,37±7,45		23,59±11,74	
Paclitaxel (nM)	CC_{20}	14,96±4,55	0,975	0,75±0,44	0,952	0,70±0,30	0,911
	CC_{50}	67,23±8,40		53,76±15,51		15,06±4,01	
	CC_{80}	573,61±16,03		305,11±14,61		301,22±15,84	
Camptotecina (nM)	CC_{20}	3,57±0,53	0,989	2,07±0,49	0,978	0,26±0,14	0,992
	CC_{50}	23,71±2,09		6,71±0,83		1,54±0,42	
	CC_{80}	57,45±26,25		21,68±4,80		9,17±3,06	

A linhagem celular L929 foi uma das primeiras linhagens celulares a ser estabelecida, sendo a cultura imortalizada pela W. R. Earle em 1948. É derivada do clone da geração 95 de tecido subcutâneo areolar e adiposo de um camundongo macho com 100 dias. Pode ser utilizada para reportar ensaios de citotoxicidade (SANFORD; EARLE; LIKEKY, 1948).

O "*wound scratch*" ou "*scratch assay*", que em tradução significa "ensaio do rasgo" é um modelo empregado para a avaliação de potencial atividade cicatrizante

(SUDSAI et al., 2013; TEWTRAKUL et al., 2015). É um modelo útil, de baixo custo e fácil execução que tem por objetivo investigar a proliferação e a migração celular de substâncias no reparo de feridas (BALEKAR et al., 2012a, 2012b).

Ensaios de cicatrização podem ser realizados *in vitro*, baseados em culturas celulares ou de tecidos, e durante muitos anos foram utilizadas para estimar as taxas de migração e proliferação de diferentes células e de diferentes condições de cultura. Esses ensaios envolvem, geralmente, em primeiro lugar o crescimento de uma monocamada de células confluentes.

Neste modelo experimental, uma lesão mecânica é aplicada com auxílio de uma ponteira em camada de células confluentes, promovendo uma faixa descontínua nas células aderidas. As células restantes, presentes na borda desta faixa precisam migrar de um lado ao outro para estabelecer novos contatos célula-célula (LOO; HALLIWELL, 2012).

O espaço aberto é então monitorado microscopicamente ao longo do tempo, como as células se movem e como preenchem a área danificada. Imagens em diferentes intervalos são obtidas em determinados pontos desta faixa, sendo possível determinar a distância entre os lados do rasgo e quantificar a migração e proliferação celular. Esta "cura" pode ter entre várias horas e ao longo de um dia, dependendo do tipo de células, condições, e a extensão da região "ferida" (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Os dados obtidos no ensaio de scratch demonstram que o tratamento com aos oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* promovem um aumento na migração celular em células da linhagem de fibroblastos L929 (**Figura 8, 9** e **10**).

As feridas em tecidos resultam em uma complexa série de eventos para seu reparo, que podem incluir a infiltração de células inflamatórias como parte do processo para remover e destruir o tecido necrótico, aumento da vascularização por fatores antigênicos, e aumento da proliferação celular e a deposição de matriz extracelular (CHEN; ABATANGELO, 1999; DOILLON et al., 1985; GURTNER et al., 2008).

A cicatrização é uma resposta de reparação, iniciada imediatamente após a ruptura da integridade da pele. É composta basicamente de 5 fases: de homeostase e inflamação, de neovascularização, de granulação, de re-epitelização e de remodelação. Estas fases são interligadas e sobrepostas, e a cronificação da lesão

ocorre com a ineficiência de alguma destas fases (DEMIRCI et al., 2014; SCHMIDT et al., 2009).

Plantas medicinais, ou suas moléculas derivadas são aplicadas como cicatrizantes pela população devido ao conhecimento etnofarmacológico, que garantem resultados eficazes com baixo custo, sendo bem tolerada pelos pacientes (BALEKAR et al., 2012a, 2012b; WANG et al., 2011). Os metabólitos secundários que apresentam atividades cicatrizantes de tecidos mais eficazes são os taninos, triterpenos e alcaloides (KUMAR et al., 2007; NAYAK; PINTO PEREIRA, 2006).

Espécies de *Copaifera* possuem como componentes majoritários compostos da classe dos terpenos, presentes na oleorresinas, que são amplamente empregadas pela população como cicatrizantes, em especial, topicamente. Diversos estudos apontam que estes efeitos cicatrizantes atribuídos são resultado dos efeitos anti-inflamatórios, vasculares e imunomoduladores, além da atividade proliferativa em fibroblastos apresentados por tais oleorresinas (GOMES et al., 2010; PAIVA et al., 1998, 2002; VIEIRA et al., 2008).

Em especial, na análise de desreplicação preliminar apresentada neste estudo observa-se a presença de compostos fenólicos, tais como os ácidos galoilquínicos e epicatequinas, que são moléculas estruturalmente parecidas, ou precursoras de taninos, podendo estar relacionadas com as atividades proliferativas observadas nos extratos das folhas de *Copaifera* spp (ADZU et al., 2015; ALVES et al., 2013; FURTADO et al., 2015; LEMOS et al., 2015).

Estes resultados reforçam ainda mais os efeitos curativos apresentados no ensaio de atividade cicatrizante sobre úlceras crônicas, apresentado no **item 5.4.3**.

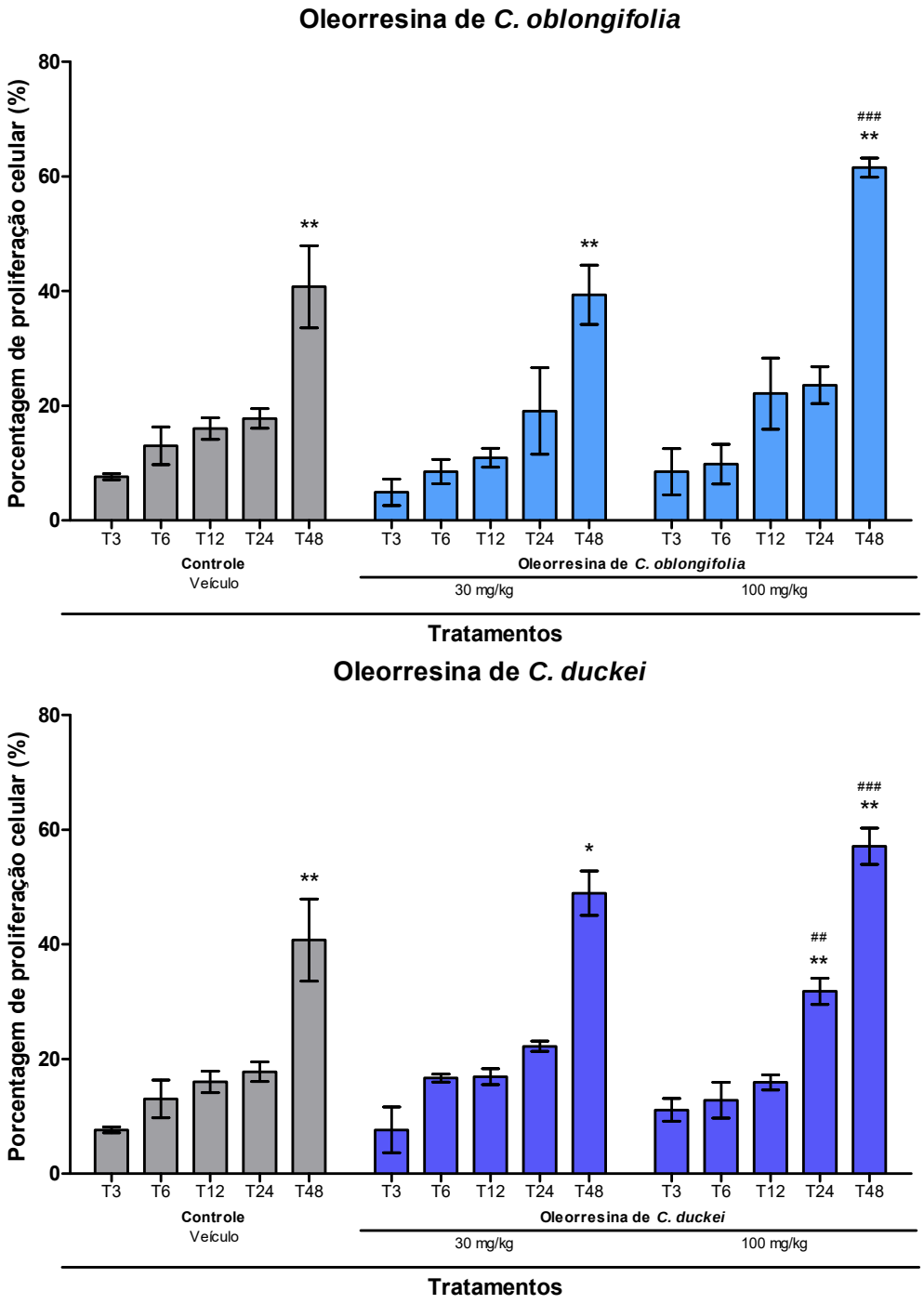


Figura 8. Gráfico do efeito sobre a proliferação de fibroblastos L929 incubados com as oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL, durante os tempos de 3, 6, 12, 24 e 48h após o *scratch* em relação ao tempo zero. Os valores representam a média ± E.P.M da % de área de cobertura nos diferentes tempos após o *scratch* em relação ao tempo zero. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, que diferem significativamente quando comparados entre diferentes tempos em um mesmo grupo e, # $p<0,05$, ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$, que diferem significativamente quando comparados ao grupo controle tratado com veículo.

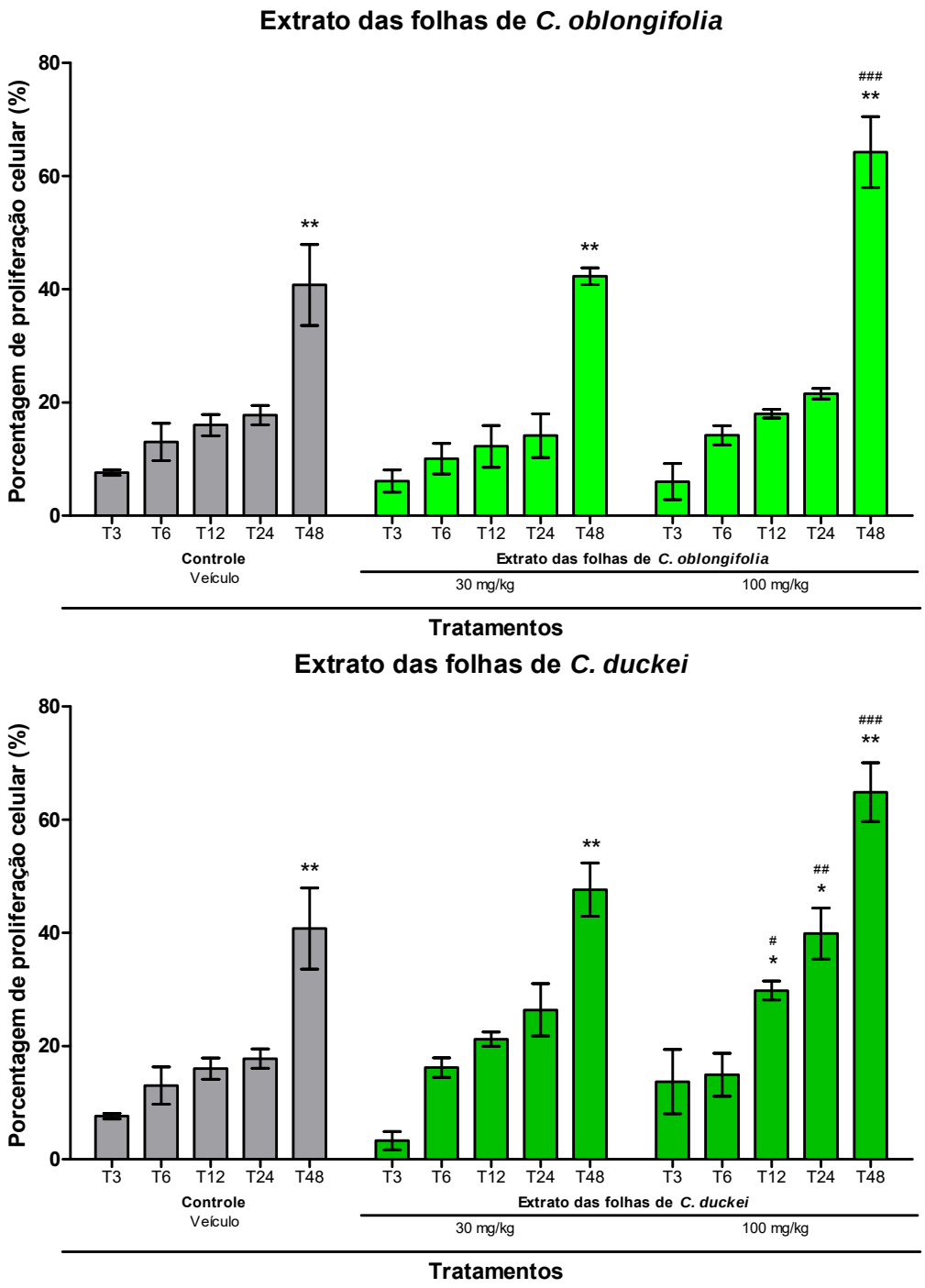


Figura 9. Gráfico do efeito sobre a proliferação de fibroblastos L929 incubados com os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL, durante os tempos de 3, 6, 12, 24 e 48h após o *scratch* em relação ao tempo zero. Os valores representam a média ± E.P.M da % de área de cobertura nos diferentes tempos após o *scratch* em relação ao tempo zero. ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, que diferem significativamente quando comparados entre diferentes tempos em um mesmo grupo e, # $p<0,05$, ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$, que diferem significativamente quando comparados ao grupo controle tratado com veículo.

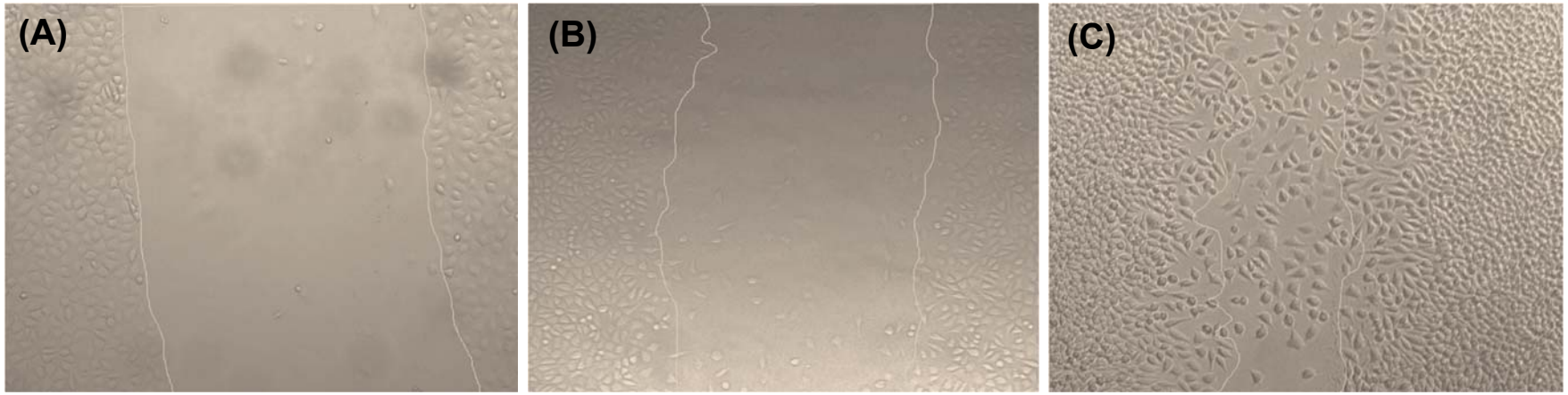


Figura 10. Imagens da monocamada de fibroblastos L929 no ensaio de *Scratch.* Imagens obtidas em objetiva de 10, e aumento total de 100x. **(A)** Representa o cultivo de fibroblastos no tempo de 0. **(B)** Representa o cultivo no tempo de 24h. **(C)** Representa o cultivo no tempo de 48h. Imagens processadas no *software* ImageJ® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 1.50i (2016) (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004; RASBAND, 2016; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

5.4.2 Efeitos gastroprotetores das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. úlceras agudas

A úlcera péptica é uma das principais desordens gastrointestinais. É causada por um desequilíbrio entre fatores agressivos (secreção ácida) e protetores (muco e bicarbonato). Consequentemente, reduzir a produção de ácido gástrico e reforçar a produção de muco são as principais abordagens no tratamento desta doença (ANDRADE et al., 2007)

A formação de lesões na mucosa gástrica por agentes necrosantes, como o etanol, é reportada por envolver a redução de mecanismos de defesa gástricos (KINOSHITA; NOTO; TAMAKI, 1995). A formação destas lesões que seguem à administração de etanol envolve diversos mecanismos: (1) uma redução no fluxo sanguíneo gástrico, contribuindo no desenvolvimento de hemorragia e necrose; (2) solubilização do muco presente no estômago, resultando em uma redução da diferença de potencial transmembrana na mucosa, aumentando o fluxo de íons Na^+ e K^+ ao lúmen, secreção de pepsina e perda de íons H^+ e histamina no lúmen; (3) indução do estresse oxidativo; (4) aumento da atividade de xantina oxidase e níveis de malondialdeído; e (5) redução nos níveis totais de glutationa nas células da mucosa gástrica (EL-ASHMAWY et al., 2016; EL-SHINNAWY; ABD-ELMAGEID; ALSHAILABI, 2014; PRABHU; SHIVANI, 2014; SANTIN et al., 2014; XU et al., 2016; ZANATTA et al., 2009).

Como resultado, os tratamentos com a oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* reduziram a quantidade da área lesada, promovendo um efeito citoprotetor frente ao agente lesivo (**Tabela 26** e **Figura 11**). Estes resultados podem envolver diversos mecanismos, tais como redução do fluxo sanguíneo gástrico (contribuindo para o desenvolvimento da hemorragia) e a manutenção dos constituintes da mucosa do estomago responsáveis pela sua integridade (KINOSHITA; NOTO; TAMAKI, 1995; WALLACE; GRANGER, 1996; XU et al., 2016).

Tabela 26. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)	DI_{50} calculada
Controle	-	58,39±5,28	27,94±2,75	-	-
Omeprazol	30	11,87±2,12**	6,41±1,09**	75,19±4,08**	-
C. oblongifolia Oleorresina	30	20,65±2,39**	8,37±1,37	60,20±4,62	15,93 mg/kg (7,90 – 32,11)
	100	15,58±1,90**	5,44±2,89**	74,39±3,04**	
	300	6,64±1,47**	3,12±2,68**	87,19±2,83**	
C. oblongifolia Extrato	30	49,39±4,30*	22,58±2,91**	28,55±3,29**	76,10 mg/kg (47,03 – 123,10)
	100	36,99±3,35**	16,96±1,72**	55,69±4,32**	
	300	31,35±4,91**	11,35±1,64**	69,78±7,27**	
C. duckei Oleorresina	30	24,71±4,20**	10,42±1,49**	60,78±4,09**	13,67 mg/kg (4,52 – 41,25)
	100	18,12±1,79**	7,94±1,24**	70,18±5,42**	
	300	8,19±1,67**	3,28±1,12**	84,36±2,95**	
C. duckei Extrato	30	39,86±2,90*	19,34±2,56**	36,69±5,49*	27,11 mg/kg (11,17 - 89,70)
	100	32,93±4,49**	14,20±1,98**	49,12±4,91**	
	300	23,35±2,78**	9,25±1,75**	58,98±4,09**	

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

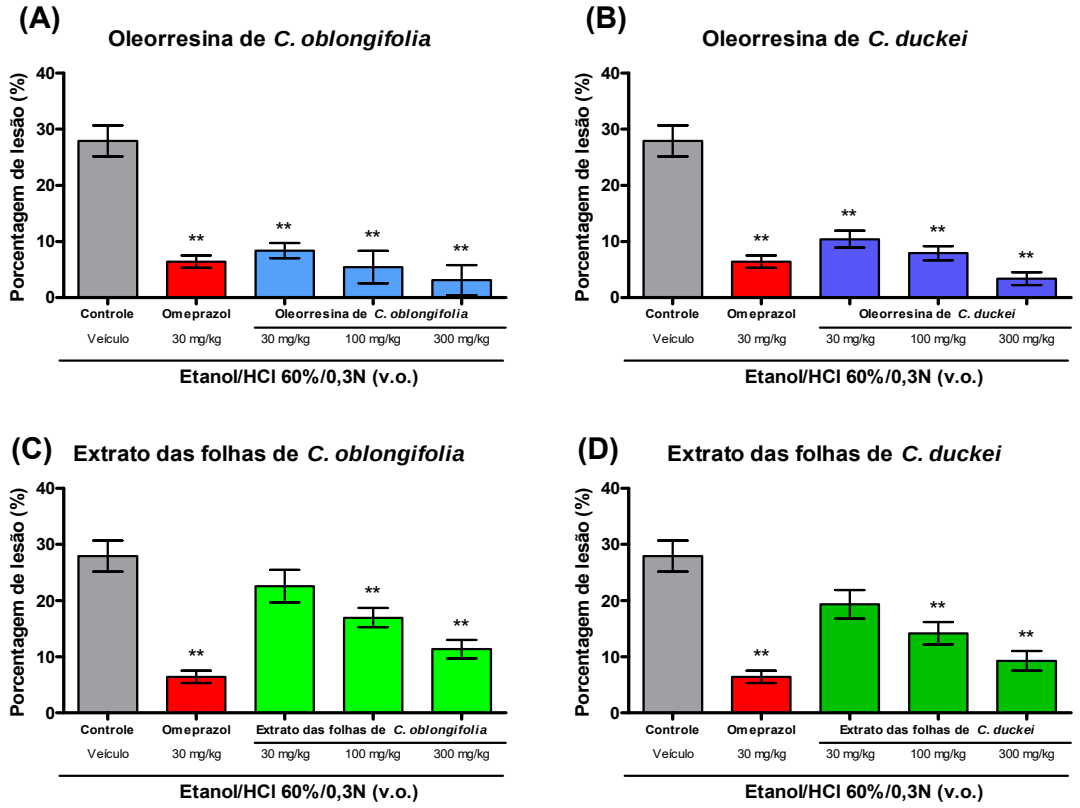


Figura 11. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* **(A** e **C)** e *C. duckei* **(B** e **D)**, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Buscando-se os possíveis metábolitos secundários responsáveis pela atividade gastroprotetora, as frações obtidas dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* foram avaliadas no modelo de úlceras agudas induzidas por EtOH/HCl na dose de 100 mg/kg, afim de se determinar qual ou quais as frações mais ativas. Todas as frações testadas apresentaram atividade citoprotetora gástrica, porém a fração diclorometânica e a fração acetato de etila demonstraram ser as mais ativas (**Tabela 27** e **Figura 12**). Pode-se sugerir que exista um efeito sinérgico entre os componentes encontrados nas folhas, sendo que estes efeitos podem estar associados à presença de terpenos e flavonoides presentes nas frações.

Tabela 27. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e das frações de *C. oblongifolia* e de *C. duckei* (100 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)
Controle	-	69.97±4.72	36.81±3.64	-
Omeprazol	30	9.54±2.85**	6.68±1.16**	81.85±4.23**
C. oblongifolia Hexano	100	42.05±3.41	21.39±4.62*	41.89±3.35*
C. oblongifolia Diclorometano	100	33.12±2.56**	15.49±2.25**	57.92±2.24**
C. oblongifolia Acetato de etila	100	35.52±2.86**	17.93±3.45**	51.29±1.84**
C. oblongifolia *n*-Butanol	100	45.14±3.01**	24.41±3.01*	33.69±1.69*
C. oblongifolia Aquosa	100	46.99±3.49*	16.52±1.38**	55.12±4.71*
C. duckei Hexano	100	52.13±4.70	16.82±2.35*	54.31±3.96*
C. duckei Diclorometano	100	20.72±1.97**	7.25±1.80**	80.30±3.86**
C. duckei Acetato de etila	100	25.29±3.48**	8.86±2.19**	75.93±2.27**
C. duckei *n*-Butanol	100	33.35±4.31**	13.01±1.87**	64.66±3.76**
C. duckei Aquosa	100	47.32±2.15*	19.35±3.85*	47.43±1.71*

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

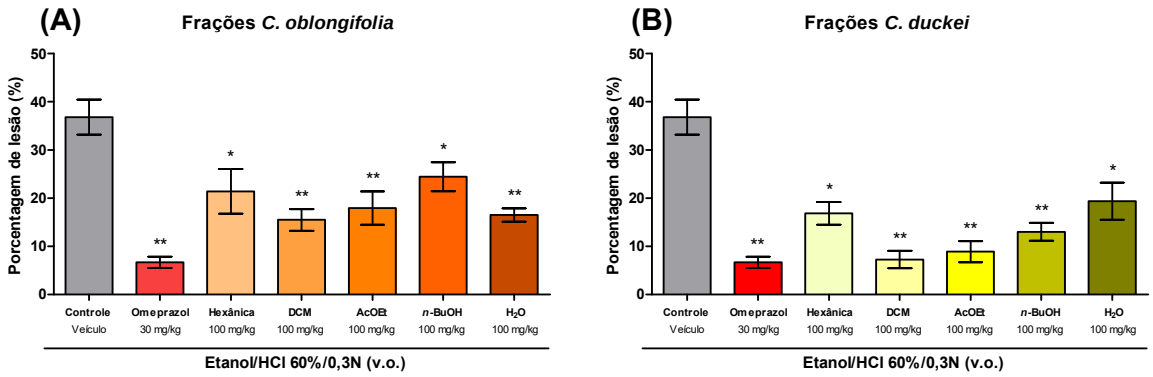


Figura 12. Gráfico do efeito da administração das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa obtidas do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* **(A)** e *C. duckei* **(B)**, na dose de 100 mg/kg, v.o. e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Complementando ainda mais a investigação sobre quais metabólitos secundários poderiam ser mais ativos, a atividade gastroprotera do ácido *ent*-agático (1), ácido caurenoico (2), ácido *ent*-poliáltico (3), afzelina (4), α-humuleno (5), β-cariofileno (6), óxido de cariofileno (7) e quercitrina (8), representados na **Figura 13** foram investigados.

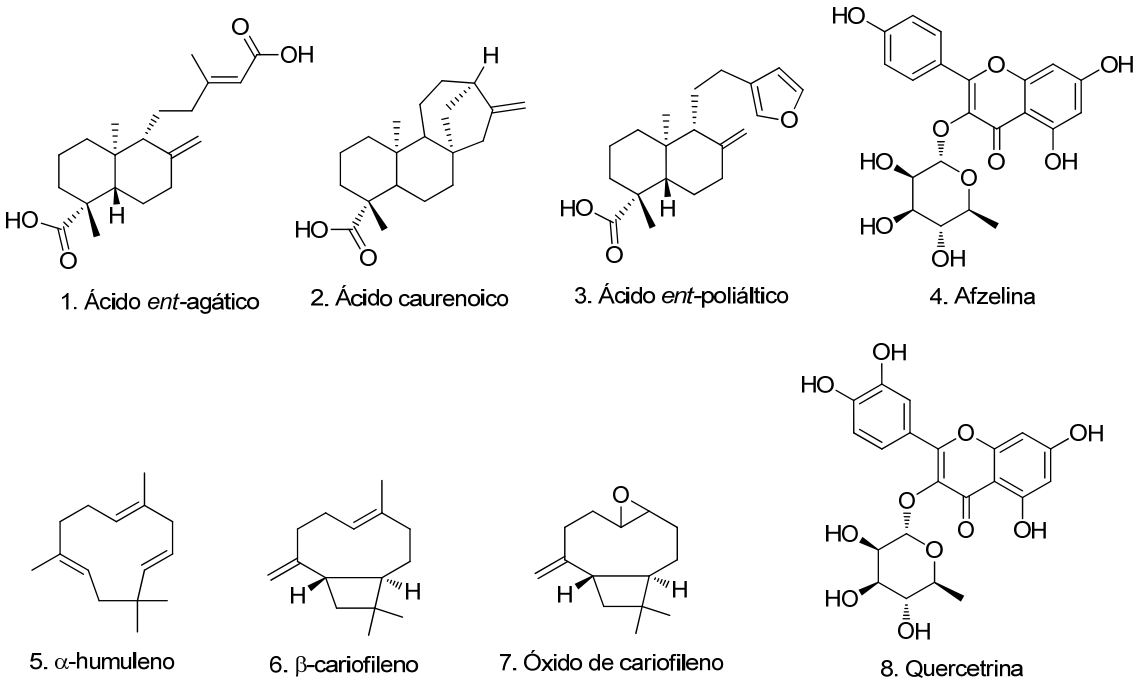


Figura 13. Estruturas químicas testadas no ensaio de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl.
Fonte: a autora, editado em *software* "ChemBioDraw® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 12.0, 2007 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Neste ensaio, os terpenos o β-cariofileno, óxido de cariofileno e α-humuleno, e o flavonoide afzelina, na dose de 30 mg/kg foram capazes de inibir a formação de lesões gástricas, promovendo um índice de cura acima de 70% (**Tabela 28** e **Figura 14**).

Tabela 28. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e de substâncias isoladas a partir da oleorresina e extrato de folhas de *Copaifera* spp. (30 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)
Controle	-	41.38±5.43	27.86±1.81	-
Omeprazol	30	9.55±2.69**	4.53±1.17**	77.58±4.67**
ácido ent-agático	30	26.50±3.40**	15.78±3.79*	47.89±4.13*
ácido caurenoico	30	15.98±3.58**	7.55±1.34**	60.91±5.76**
ácido poliáltico	30	19.95±3.85**	13.25±3.32*	50.76±5.12*
afzelina	30	8.38±1.64**	5.40±1.31**	79.50±6.10**
α-humuleno	30	9.83±1.88**	5.36±1.14**	75.95±4.59**
β-cariofileno	30	8.06±1.73**	3.90±1.03**	80.29±6.25**
óxido de cariofileno	30	9.86±3.82**	5.20±2.16**	76.26±4.02**
quercitrina	30	16.86±3.36**	8.97±1.21**	58.76±5.42**

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (* *p*<0,05 e ***p*<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

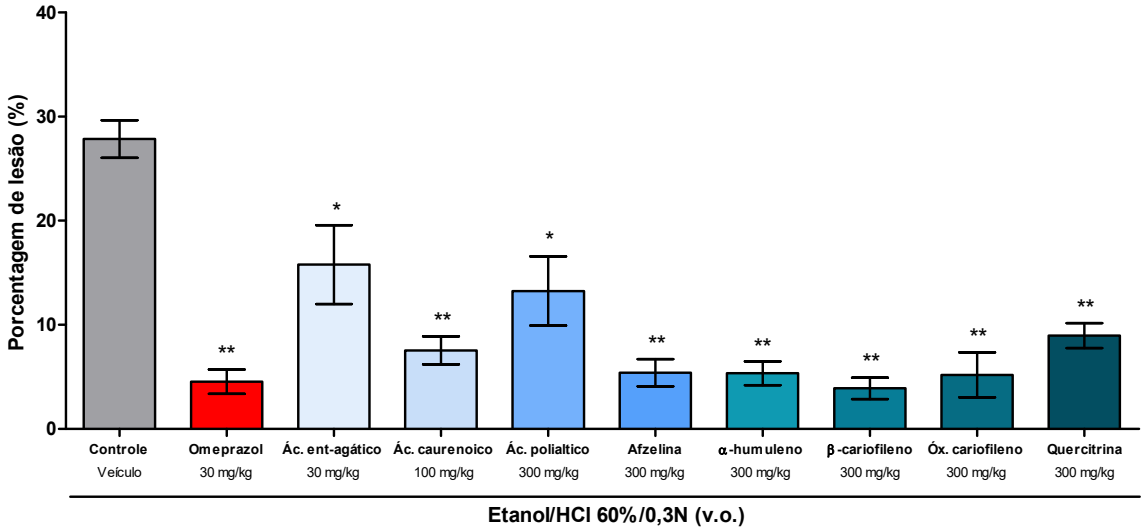
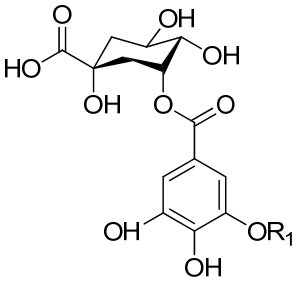
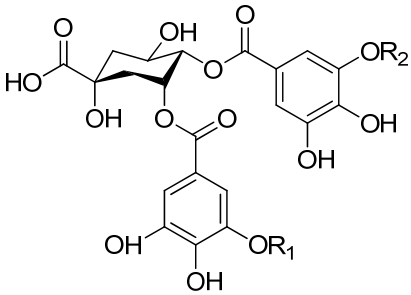


Figura 14. Gráfico do efeito da administração do ácido *ent*-agático, ácido caurenoico, ácido polialtico, afzelina, α-humuleno, β-cariofileno, óxido de cariofileno e quercetrina, na dose de 30 mg/kg, v.o., e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

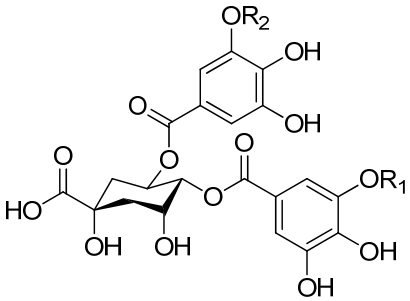
Em outra etapa, como o extrato das folhas de espécies de *Copaifera* spp. é rico em derivados galoilquínicos, onde 16 destes foram testados no modelo de úlceras gástricas por Et/OH. Além desses, o ácido gálico e o ácido quínico foram testados para fins comparativos (**Figura 15**).



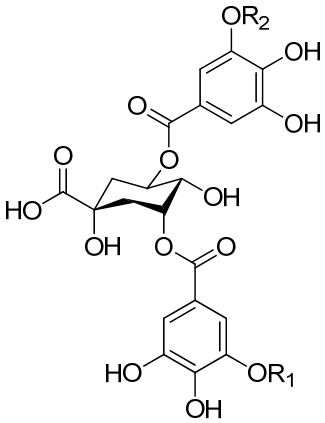
1.



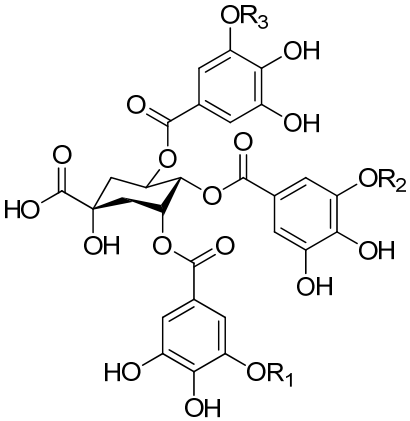
2. R1 = R2 = CH2
3. R1= H; R2 = CH3
8. R1 = CH3; R2 = H
9. R1 = R2 = H



7. R1 = R2 = CH3
11. R1 = CH3; R2 = H
12. R1 = H, R2 = CH3
13. R1 = R2 = H



4. R1 = R2 = CH3
5. R1 = H; R2 = CH3
6. R1 = CH3; R2 = H
10. R1 = R2 = H



14. R1 = R2 = R3 = CH3
15. R1 = R3 = H; R2 = CH3
16. R1 = R2 = R3 = H

Figura 15. Estruturas químicas testadas no ensaio de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl.
Fonte: a autora, editado em *software* "ChemBioDraw® para sistema operacional Windows (64 bits)", versão 12.0, 2007 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Todos, os 16 derivados isolados diminuíram a lesão gástrica no teste induzido por etanol/HCl, sendo que ácido 4-*O*-(galoil 3-*O*-metil)-5-*O*-(galoil)-quínico (**11**), ácido 4-*O*-(galoil)-5-*O*-(galoil 3-*O*-metil)-quínico (**12**) e o ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico (**13**) foram mais efetivos, reduzindo significativamente a área total da lesão, a percentagem lesão e aumentando assim o índice de cura ($p<0,01$), promovendo índices de cura de 78%, 85% e 81% respectivamente. Esta atividade parece ter correlação estrutural, tendo em vista que estes derivados galoilquínicos apresentam substituições nos carbonos de posição 4 e 5 do resíduo de ácido gálico (**Tabela 29** e **Figura 16**).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato das folhas de *Copaifera langsdorffi* apresenta efeitos gastroprotetores *in vivo* (LEMOS et al., 2015). Os ácidos gálicos presentes nos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* apresentam atividade gastroprotetora *in vivo* quando administrados isoladamente.

No ensaio de úlceras induzidas por EtOH/HCl, o etanol é responsável pela diminuição dos mecanismos de defesa presentes no estômago, reduzindo o fluxo sanguíneo, que resulta em desenvolvimento de necrose, além de solubilizar o muco, aumentando o fluxo de íons sódio e potássio para o lúmen, bem como aumentando o aumento de secreção de pepsina, íons H^+ e histamina (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; SCHUBERT; PEURA, 2008; SHAH et al., 2003; WALLACE, 2008).

O etanol também promove estresse oxidativo, aumenta a atividade da enzima xantina oxidase e os níveis de malondialdeído e redução dos níveis totais de glutationa em células gástricas (EL-SHINNAWY; ABD-ELMAGEID; ALSHAILABI, 2014; KWIECIEŃ et al., 2004; TAN et al., 2000).

Estudos com extratos de folhas de *Byrsonima intermedia* sugerem que os principais metabólitos secundários encontrados em suas folhas, tais como flavonóides e ácidos fenólicos, podem ser os responsáveis pela atividade gastroprotetora *in vivo* (SANTOS et al., 2012). Semelhante atividade gastroprotetora foi observada a partir de extratos hidro-alcoólicos de folhas de *Camellia sinensis*, que contém uma grande variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides e ácidos galoilquínicos (SCOPARO et al., 2014). Além disso, quanto polifenóis em geral, flavonóides, taninos condensados, e ácidos galoilquínicos são bem conhecidos por exibir atividade antioxidante (BOUCHET; BARRIER; FAUCONNEAU, 1998; FANTINI et al., 2015) e, assim, resultar em atividade gastroprotetora.

Tabela 29. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e pantoprazol (30 mg/kg), do ácido gálico, do ácido quínico e de 16 ácidos galoilquínicos (30 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

n.	Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)
	Controle	-	48.78±4.46	37.06±1.74	-
	Omeprazol	30	9.55±2.69**	4.53±1.17**	77.58±4.67**
AG	ácido gálico	30	18.65±4.82**	9.03±1.82**	60.74±5.60**
AQ	ácido quínico	30	22.05±1.66*	11.20±0.76**	44.92±3.62**
01	ácido 5'-O-metil-3-O-galoilquínico	30	18.02±3.30**	7.02±1.43**	56.09±4.04**
02	ácido 5',5''-di-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico	30	25.14±4.23*	11.60±1.78*	47.09±4.97*
03	ácido 5''-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico	30	33.71±4.82*	12.94±2.32*	34.73±4.84*
04	ácido 5',5''-di-O-metil-3,5-di-O-galoilquínico	30	17.79±1.95**	9.55±1.04**	56.65±4.75**
05	ácido 5''-O-metil-3,5-di-O-galoilquínico	30	18.85±4.78*	10.60±3.25**	71.70±5.65**
06	ácido 5'-O-metil-3,5-di-O-galoilquínico	30	13.75±2.36**	8.57±1.44**	66.49±4.78**
07	ácido 5',5''-di-O-metil-4,5-di-O-galoilquínico	30	11.54±1.12**	5.93±0.43**	71.87±2.70**
08	ácido 5'-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico	30	19.41±3.30*	10.72±1.84**	52.69±5.08**
09	ácido 3,4-di-O-galoilquínico	30	14.94±3.92**	11.28±2.23*	63.59±5.45*
10	ácido 3,5-di-O-galoilquínico	30	10.34±1.91**	6.12±1.07**	74.79±4.67**
11	ácido 5'-O-metil-4,5-di-O-galoilquínico	30	8.91±1.46**	6.32±0.93**	78.29±3.57**
12	ácido 5''-O-metil-4,5-di-O-galoilquínico	30	5.99±1.66**	4.56±1.29**	85.40±4.05**
13	ácido 4,5-di-O-galoilquínico	30	7.48±1.75**	5.82±1.26**	81.76±4.27**
14	ácido 5',5'',5'''-tri-O-metil-3,4,5-tri-O-galoilquínico	30	13.90±3.69**	8.54±2.56**	66.24±4.98**
15	ácido 5''-O-metil-3,4,5-tri-O-galoilquínico	30	23.97±3.96*	11.57±2.53*	48.90±5.89*
16	ácido 3,4,5-tri-O-galoilquínico	30	13.85±2.90**	6.89±1.42**	66.43±5.07**

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

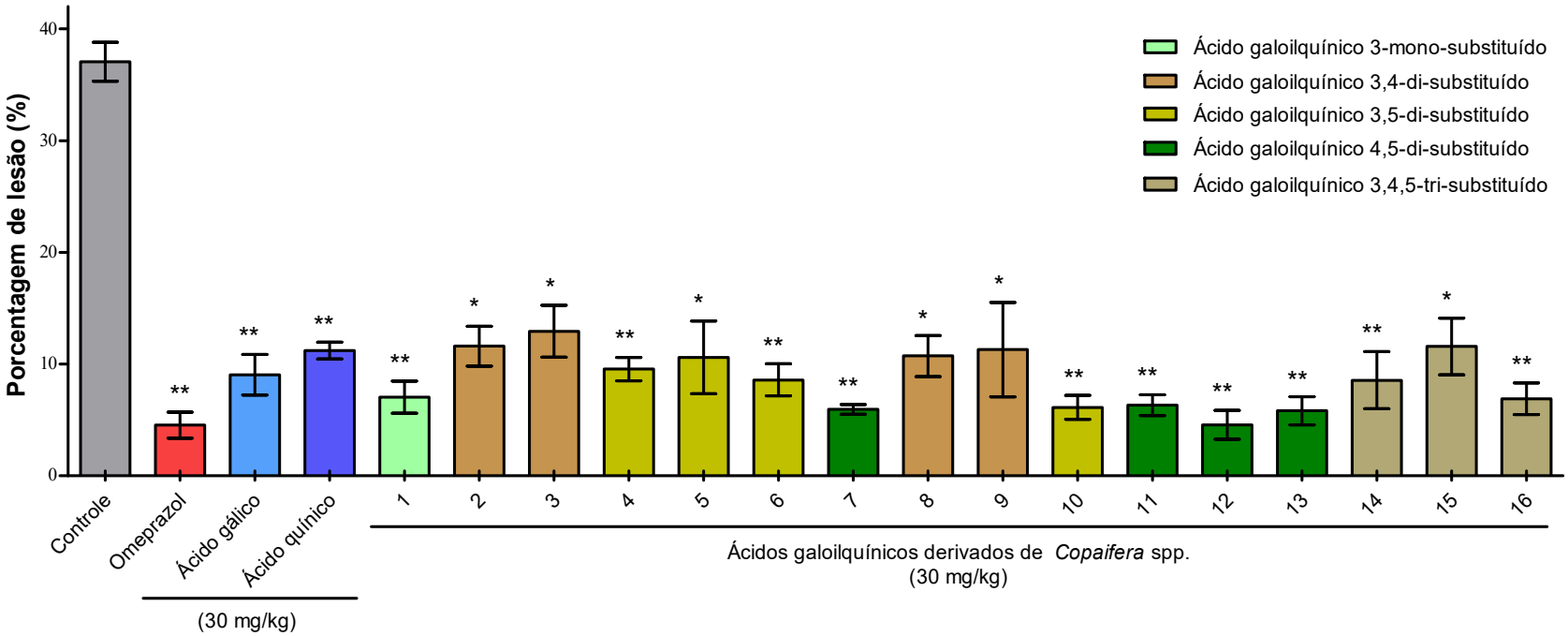


Figura 16. Gráfico do efeito da administração dos ácidos galoilquínicos presentes no extrato das folhas de espécies de *Copaifera* spp., na dose de 30 mg/kg, v.o., do ácido gálico, na dose de 30 mg/kg, v.o., do ácido quínico, na dose de 30 mg/kg, v.o., e omeprazol, na dose de 30 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,3N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Um dos principais efeitos colaterais dos anti-inflamatórios não-esteroidais é a ulceração gástrica decorrente da diminuição da síntese de prostaglandinas por inibição da enzima ciclo-oxigenase 1 (CRYER, 2000). PGE_2 e PGI_2 produzidas no estômago pela COX-1 desempenham um importante papel na proteção do epitélio gástrico (SUGIMOTO; NARUMIYA; ICHIKAWA, 2000; WALLACE, 2008).

Através da ação em receptores específicos denominados receptores EP – acoplados a proteína G – a PGE_2 e a PGI_2 promovem a liberação de IP_3 e DAG, que ativam a via-adenilato-ciclase-AMP e resultando em aumento da secreção de muco e bicarbonato, a resistência epitelial e o fluxo sanguíneo na mucosa (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; NØRSETT et al., 2005; WALLACE; MA, 2001).

Os dados obtidos no modelo de úlceras induzidas por indometacina corroboram com dados obtidos no modelo de úlcera aguda induzida por EtOH/HCl. Provavelmente, o mecanismo gastroprotetor envolvido compreende a inibição da migração de células inflamatórias para o tecido inflamado da mucosa gástrica (**Tabela 30** e **Figura 17**). (KLEIN-JÚNIOR et al., 2012; MUSUMBA; PRITCHARD; PIRMOHAMED, 2009; SCHMASSMANN, 1998).

Tabela 30. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por AINEs (indometacina, 100mg/kg) em camundongos.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)	DI_{50} calculada
Controle	-	24.87±1.96	12.59±2.03	-	-
Ranitidina	100	8.85±1.17**	4.64±0.58**	73.71±4.87	-
C. oblongifolia Oleorresina	30	12.08±2.72**	4.17±1.84**	55.43±4.58	33,65 mg/kg (29,04 – 38,09)
	100	7.29±2.69**	2.84±1.05**	79,61±5.81	
	300	3.82±0.91**	1.01±0.27**	88.26±3.50	
C. oblongifolia Extrato	30	16.25±3.48*	6.32±1.33**	53.24±4.75	38,18 mg/kg (7,88 – 46,16)
	100	9.42±2.68**	5.75±1.78**	77.64±5.16	
	300	4.46±1.47**	4.45±1.34**	85.75±4.23	
C. duckei Oleorresina	30	12.51±2.91**	3.11±0.46**	42.09±3.47	29,07 mg/kg (10,47 – 47,83).
	100	5.45±1.03**	2.78±0.50**	74.77±4.76	
	300	1.55±0.36**	0.86±0.18**	92.82±6.68	
C. duckei Extrato	30	10.57±2.08**	5.21±1.04**	51.06±6.65	47,45 mg/kg (29,83 – 25,48).
	100	8.50±1.57**	4.12±0.41**	60.67±5.28	
	300	4.98±1.49**	2.70±1.22**	76.93±5.61	

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

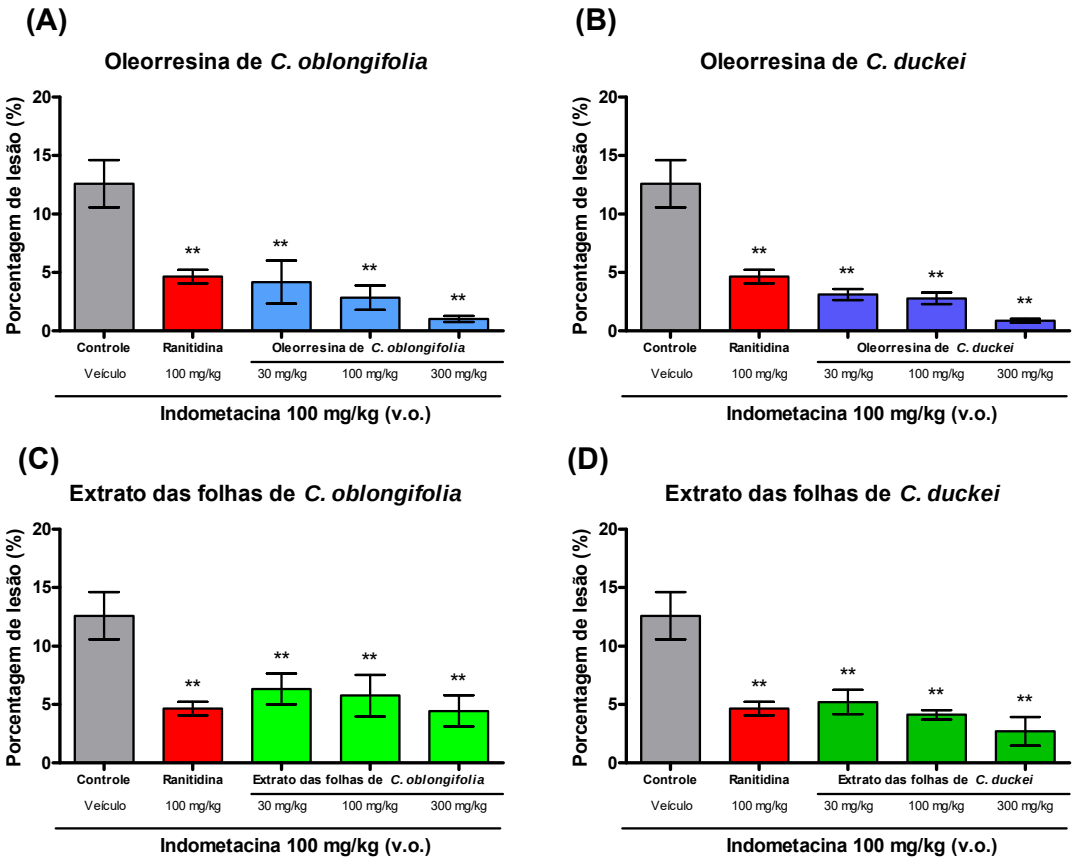


Figura 17. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. e ranitidina, na dose de 100 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por AINE (indometacina, 100 mg/kg) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

5.4.3 Efeitos gastroprotetores das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. úlceras crônicas

Para avaliar os efeitos curativos da oleorresina ou do extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* foi empregado o modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético. Este ensaio consiste na aplicação de uma injeção de ácido acético na camada subserosa externa do estômago, sendo o modelo que mais se assemelha a úlcera em humanos, tanto em termos de características patológicas e a localização, quanto aos mecanismos de cicatrização (DE PAULA et al., 2008; TAKAGI; OKABE; SAZIKI, 1969). Em contato com a mucosa, o ácido acético inicia a lesão com dano vascular e necrose isquêmica, além de destruir a barreira protetora gástrica, promover mudanças no padrão de aderência do muco, formar espécies reativas de oxigênio, alterar a

microcirculação, diminuir a liberação de fatores de crescimento tecidual e produção de prostaglandinas, óxido nítrico, citocinas, promovendo a apoptose (OKABE; AMAGASE, 2005).

Há três fases distintas de cicatrização: (1) necrose, (2) infiltração inflamatória e (3) formação da margem da úlcera e início da cicatrização (OKABE; AMAGASE, 2005; SCHMASSMANN, 1998; TARNAWSKI, 2005). O processo de cicatrização gástrica é complexo, e envolve a reparação da lesão através da formação de tecido de granulação, re-epitelização e remodelamento da matriz extracelular, que resulta na reconstrução da mucosa. Esse processo inclui o restabelecimento da superfície epitelial, reorganização das glândulas mucosas, aumento da síntese e da liberação de mucinas ácidas, proliferação, migração e diferenciação celular (FORNAI et al., 2011; S. TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013). Durante o dano vascular ocorre liberação de mediadores que causam quimiotaxia de leucócitos e macrófagos, liberando citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF-α, a IL-1β e a IL-8, e envolvendo a enzima ciclo-oxigenase 2 no processo de reparo tecidual. A expressão de COX-2 parece controlar os mecanismos de re-epitelização, angiogênese, citoproteção e proliferação celular epitelial (mediada por EGF) (SCHMASSMANN, 1998; TARNAWSKI, 2005; WALLACE; MA, 2001).

A administração oral por 7 dias da oleorresina ou do extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* favoreceu o processo de cicatrização, diminuindo o diâmetro da lesão quando comparado ao grupo controle (**Tabela 31**), além de diminuir a espessura da mucosa gástrica (**Tabela 32**), e a infiltração leucocitária no local da lesão (**Tabela 33**). Observa-se também que a oleorresina ou o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* aumenta o número de células em proliferação na região de regeneração da úlcera, em relação ao grupo controle. Com esses dados, é possível concluir que, pelo menos em parte, a proliferação celular contribui para a cicatrização da úlcera (CZYZEWSKA et al., 2009).

Tabela 31. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) em camundongos.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)
Controle	-	38.06±3.08	14.98±1.63	-
Ranitidina	100	10.84±1.76**	6.06±1.58**	75.56±6.06**
C. oblongifolia Oleorresina	300	12.49±2.98**	6.48±1.31**	76.69±6.33**
C. oblongifolia Extrato	300	10.42±3.92**	5.46±1.93**	70.89±6.96**
C. duckei Oleorresina	300	9.04±3.46**	5.40±1.86**	74.74±7.68**
C. duckei Extrato	300	6.08±2.61**	3.48±1.46**	83.22±5.31**

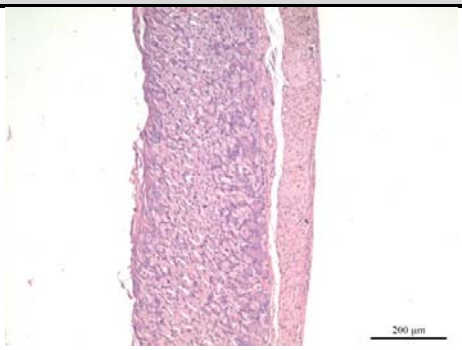
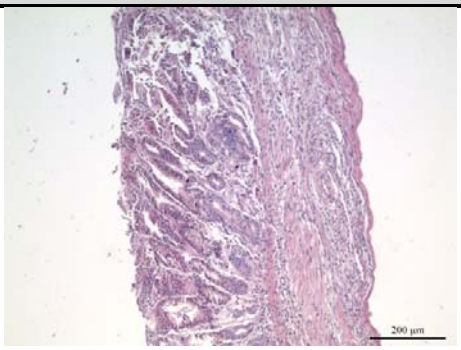
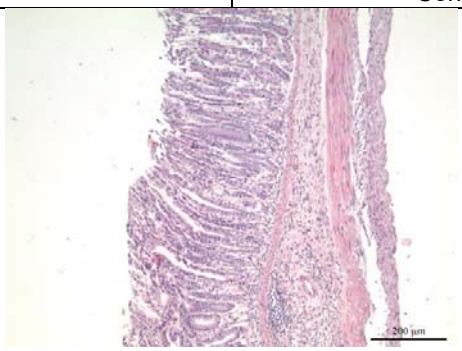
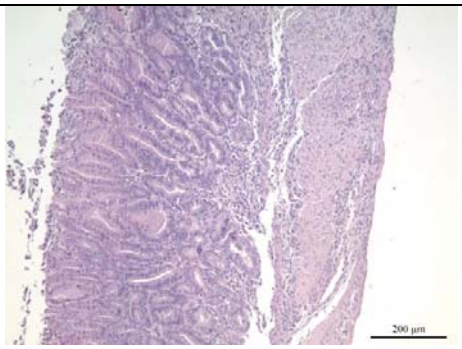
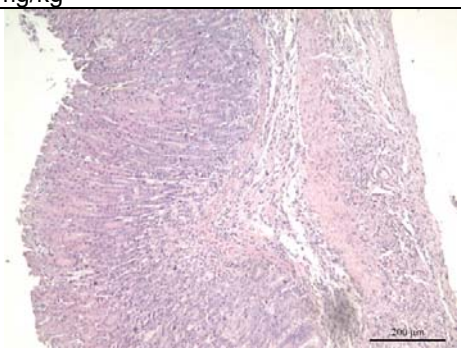
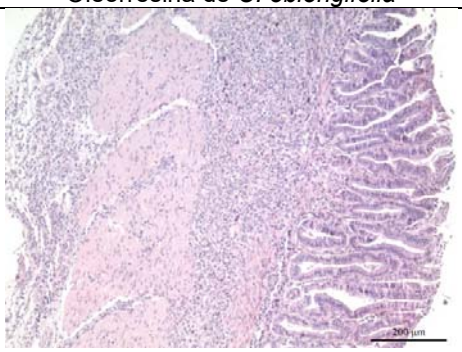
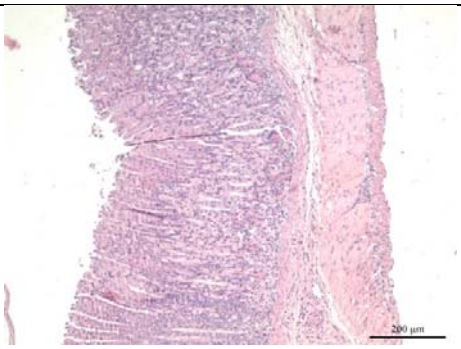
Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Tabela 32. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) em camundongos.

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Espessura da mucosa gástrica (µm)	Espessura da muscular gástrica (µm)	Classificação por pontuação (0 – 4)
Naïve	-	218,69±8,60	67,59±7,27	0
Controle	-	313,72±13,19	317,01±32,94	4
Ranitidina	100	205,39±11,32	157,86±11,39	1
C. oblongifolia Oleorresina	300	276,30±10,65	273,22±13,79	3
C. oblongifolia Extrato	300	241,94±10,17	221,88±10,05	3
C. duckei Oleorresina	300	223,52±8,70	269,23±16,31	2
C. duckei Extrato	300	241,95±13,84	165,07±15,35	2

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Tabela 33. Detalhes de cortes histológicos de estômagos após a administração oral da oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg), durante 7 dias em animais submetidos ao teste de úlceras crônicas por ácido acético.

Mucosa e muscular do estômago Corte transversal em aumento de 4000x	
 Naïve	 Controle Negativo
 Ranitidina 100 mg/kg	
 Oleorresina de *C. oblongifolia*	 Oleorresina de *C. duckei*
 Extrato das folhas de *C. oblongifolia*	 Extrato das folhas de *C. duckei*

5.4.4 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* sobre a secreção gástrica e a quantidade de muco gástrico (ligadura de piloro)

Como mencionado anteriormente, a mucosa possui papel importante no restabelecimento da integridade gástrica. Este papel, em grande parte está associado com a presença de muco, que contribui significativamente para o reparo dos danos. O muco é um fator protetor importante que reveste continuamente a mucosa gástrica e é a primeira linha de defesa contra agentes nocivos como o ácido ou bactérias (PHILLIPSON et al., 2008). Sua composição é água (95%) e de glicoproteínas (5%), denominadas mucinas, que formam um gel transparente, viscoso e elástico, com propriedades aderentes que retarda a difusão do ácido para as células do epitélio gástrico (MOJŽIŠ; HEGEDÜŠOVÁ; MIROSSAY, 2000).

Durante o processo de ulcerogênese gástrica, o ácido clorídrico acaba sendo hipersecretado, intensificando as lesões e reduzindo a proteção da mucosa (ANDRADE et al., 2007; KWIECIEŃ et al., 2004). Reduzir a hipersecreção gástrica contribui para o processo de cicatrização, além de diminuir os episódios de reincidia. Além disso, tradicionalmente a terapia antiúlcera gástrica era focada em estratégias para diminuir a liberação do ácido gástrico. Porém, essas terapias não possuem mecanismos para reduzir o processo inflamatório e favorecer o processo de cicatrização. Atualmente, estudos investigam novas estratégias terapêuticas para a resolução do processo inflamatório envolvido na fisiopatologia da úlcera gástrica (ALESSANDRI et al., 2013; LEE; SURH, 2012; ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013). No modelo de ligadura de piloro foram avaliadas a atividade da oleorresina ou do extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* sobre a secreção gástrica ácida e sobre a produção de muco, que são duas importantes funções do estômago (**Tabela 34**). Sabe-se que a úlcera gástrica é causada por um desequilíbrio entre os fatores agressivos (HCl, pepsina) e a habilidade da mucosa gástrica de se proteger e curar a si própria (muco e secreção de HCO_3^-, PGs, fluxo de sangue e óxido nítrico) (LU; GRAHAM, 2006).

Tabela 34. Efeitos da administração intraduodenal de indometacina (100 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (30, 100 e 300 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica ácida e na secreção de muco de camundongos submetidos à ligadura de piloro.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	pH	Volume de secreção (µL)	$[H^+]$ ($mEq.g^{-1}/L$)	Quantidade de Alcian Blue ligado (mg/g tecido)
Controle	-	5.15±0.23	0.192±0.011	165.26±16.31	6.08±0.36
Indometacina	100	4.31±0.19	0.336±0.061	260.50±18.30	4.17±0.95
Ranitidina	100	5.90±0.13**	0.118±0.015**	62.41±18.94*	6.65±0.41
Carbenoxolona	200	5.87±0.24**	0.137±0.015**	48.76±5.83*	7.78±0.17**
C. oblongifolia Oleorresina	30	5.40±0.33	0.165±0.011**	87.38±10.51	5.03±0.94
	100	5.27±0.26	0.098±0.016**	73.92±7.83*	6.67±0.53*
	300	5.17±0.33	0.079±0.007**	49.92±9.90**	8.62±0.67**
C. oblongifolia Extrato	30	5.73±0.26*	0.203±0.022	50.98±6.29**	6.34±0.59
	100	5.82±0.33**	0.152±0.018**	47.40±5.12**	7.04±0.24*
	300	6.59±0.08**	0.138±0.042**	38.41±9.45**	7.49±0.16**
C. duckei Oleorresina	30	4.89±0.18	0.218±0.025	71.84±5.85	4.95±0.30
	100	4.50±0.26	0.153±0.018**	66.70±8.25*	6.42±0.29*
	300	4.75±0.22	0.125±0.017**	53.67±7.32**	6.85±0.11**
C. duckei Extrato	30	4.63±0.05	0.202±0.093	58.36±7.32*	6.69±1.09
	100	4.73±0.43*	0.113±0.011**	40.51±6.41**	10.55±0.51*
	300	5.80±0.25**	0.095±0.007**	38.54±7.42**	11.62±0.40**

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey. Curva Alcian Blue: y = 0.0017x - 0.0059; R^2 = 0.9979

Diversos fatores podem aumentar o risco de incidência de úlcera, tais como o estresse, o fumo, deficiências nutricionais, uso de AINEs, predisposição hereditária e infecção por *Helicobacter pilory* (BARROS et al., 2008; SCHUBERT; PEURA, 2008).

(BARROS et al., 2008). O pré-tratamento oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei* não altera o pH significativamente, porém, diminui a quantidade de íons hidrogênio liberados na sereção. Já o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* parece interferir de forma satisfatória nestes dois parâmetros, visto que diminui tanto o pH quanto a quantidade de íons secretados. Ainda, o extrato das folhas, principalmente o extrato das folhas de *C. duckei* promoveu significativo aumento do muco. O muco é um dos fatores protetores da mucosa gástrica, criando uma barreira física contra bactérias, ácidos, toxinas, além de agir como um lubrificante, reduzindo o atrito e os efeitos abrasivos sobre a mucosa. O muco tem a capacidade de sequestrar radicais livres, devido a sua composição glicoproteica (MOJŽIŠ; HEGEDÜŠOVÁ; MIROSSAY, 2000; WALLACE; MILLER, 2000; WALLACE, 2008).

5.5 Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori*

5.5.1 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bacteriana mínima (CBM)

A bactéria *Helicobacter pylori* é um bacilo Gram negativo, microaerófilo, curvo e espiralado (ALARCÓN; DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 1999; DUNN; COHEN; BLASER, 1997; MARSHALL; WARREN, 1984). Este bacilo contém dois a seis flagelos que lhe oferecem motilidade e resistência no ambiente estomacal, permitindo-lhe penetrar na mucosa gástrica e resistir aos movimentos contráteis estomacais. Possuem de 2,4 a 4,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura. Embora seja encontrado em outros primatas, seu principal reservatório é o estômago humano, principalmente o antro. Produz uma enzima, a urease, que reduz a ureia ema amônia, capacitando o micro-organismo para sobreviver no estômago por criar uma ambiente alcalino (BROWN, 2000).

A infecção causada por *H. pylori* afeta cerca de metade da população mundial, sendo mais frequentemente adquirida na infância, e em países em desenvolvimento. Segundo dados da OMS, ao ano, 550.000 novos casos de câncer de estômago são atribuídos à bactéria *H. pylori,* que pode ser transmitida pelos alimentos. Este dado corresponde a 55% dos casos de câncer do mundo (DUNN; COHEN; BLASER, 1997; PARSONNET, 1998; RAJINDRAJITH; DEVANARAYANA; SILVA, 2009; WHO; UNICEF, 2000). Os resultados da triagem anti-*H. pylori* pelo método da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima demostraram que a oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* foram ativos (**Tabela 35**) possuem moderada atividade contra a bactéria. Buscando-se quais eram os compostos mais ativos, as frações do extrato foram testadas, sendo que as frações hexânica e diclometânica (**Tabela 36**) apresentaram maior atividade. Estes resultados confirmam a presença de substâncias antimicrobianas (SOUZA et al., 2011a, 2011b), sendo que substâncias da classe dos terpenos devam ser as responsáveis por tais atividades.

Tabela 35. Resultados da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* sobre a bactéria *Helicobacter pylori*

Tratamento	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Oleorresina de *C. oblongifolia*	200	200
Extrato de *C. oblongifolia*	100	100
Oleorresina de *C. duckei*	> 400	> 400
Extrato de *C. duckei*	> 400	> 400

Tabela 36. Resultados da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* sobre a bactéria *Helicobacter pylori*

Tratamento	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Fração Hexânica	100	200
Fração CH_2Cl_2	200	400
Fração AcOEt	> 400	> 400
Fração BuOH	> 400	> 400
Fração H_2O	> 400	> 400
Claritromicina	0,078	0,078

5.5.2 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre animais infectados por *Helicobacter pylori* submetidos à úlceras crônicas por ácido acético

Por apresentar maior atividade anti-*H. pylori* nos testes *in vitro*, a oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* foram selecionados para realização de ensaios anti-*H. pylori in vivo*.

O modelo de úlcera crônica por ácido acético penetra na camada muscular e assemelha-se em características patológicas e de processo cicatricial com a úlcera gástrica em humanos. Na tentativa de estabelecer a ligação patogênica entre o *H. pylori*, foi realizado o ensaio de úlceras crônicas induzidas por ácido acético com co-infecção por *H. pylori*. O estabelecimento de infecção persistente de *H. pylori* em camundongos, que reproduza as características básicas da infecção em humanos não é uma tarefa fácil (BUI et al., 1991; LI et al., 2008; YAN; LUO; MAO, 2004).

A inoculação de *H. pylori* retarda a cicatrização de úlceras gástricas, possivelmente por redução das secreções de gastrina e pepsina gástricas seguida de aumento na gastrina plasmática e queda no conteúdo de somatostatina luminal,

contribuindo para alterações no fluxo sanguíneo gástrico e mudanças histopatológicas como edema ou congestão da superfície epitelial, infiltração inflamatória e aumento dos níveis de IL-1β e IL-12 (KONTUREK et al., 1999).

Nesta primeira etapa estabelecemos se este modelo era passível de padronização em nossos laboratórios. Os dados obtidos confirmam a atividade cicatrizante da oleorresina e do extrato das folhas de *C. oblongifolia* apresentada no modelo de úlceras induzidas por ácido acético (**Tabela 37**). Pode-se notar um aumento do diâmetro da lesão, compatível com os dados da literatura. Como pode-se observar, após 7 dias de tratamento e co-infecção, o teste de urease é positivo apenas no grupo controle (**Tabela 38**).

Tabela 37. Efeitos da administração oral de claritromicina (25mg/kg) + amoxicilina (50 mg/kg) + omeprazol (20 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) com co-infecção por *Helicobacter pylori* em camundongos.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)
Controle	-	42,64±3,51	21.16±2.13	-
Claritromicina + Amoxicilina + Omeprazol	25 + 50 + 20	13,76±2.41**	10,41±2.48**	51,83±5.77**
C. oblongifolia Oleorresina	300	16,94±2.97**	12,11±2.71**	42,66±4,39**
C. oblongifolia Extrato	300	14,28±3.02**	11,98±2.74**	44,92±2,12**

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Tabela 38. Efeitos da administração oral de claritromicina (25mg/kg) + amoxicilina (50 mg/kg) + omeprazol (20 mg/kg) e da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) com co-infecção por *Helicobacter pylori* em camundongos.

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Teste de Urease	
Controle	-	+++	
Claritromicina + Amoxicilina + Omeprazol	25 + 50 + 20	-	
C. oblongifolia Oleorresina	300	-	
C. oblongifolia Extrato	300	-	

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle ($^{*}p<0,05$ e $^{**}p<0,01$), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

5.5.3 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre a atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante das oleorresinas e extratos de *C. oblongifolia* e *C. duckei* consistiu na execução de um conjunto de ensaios in *vitro* que permitiu estudar a capacidade destes para captarem as principais ROS que estão envolvidos na patogênese das desordens gástricas.

A atividade sequestradora de radical/habilidade de doar H^+ pela oleorresina e pelo extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* foi quantificada empregando o radical estável $DPPH^{\bullet}$ em solução metanólica. A solução metanólica do radical DPPH• apresenta absorvância máxima em 515nm, na presença de moléculas doadoras de H^+ a absorvância diminui devido à redução do DPPH• para DPPH-H.

As oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* não apresentaram habilidade de doar H^+ ao $DPPH^{\bullet}$ (**Tabela 39**), embora literatura reporta que tais oleorresinas tenham tal atividade (SANTOS et al., 2009). Já os extratos das folhas são ricos em compostos fenólicos, tais como os flavonoides e derivados galoilquínicos, que possuem atividade antioxidante descrita na literatura (BARATTO et al., 2003; CHEN et al., 2010).

Tabela 39. Resultados da concentração efetiva máxima (EC_{50}) e dos coeficientes de correlação linear (R^2) obtidos pelo ácido gálico, pela oleorresina e pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na avaliação da atividade doadora de H• ao radical DPPH•

Material vegetal	EC_{50} (µg/mL)	R^2
Oleorresina de *C. oblongifolia*	>5000	-
Extrato de *C. oblongifolia*	317,00	0,995
Oleorresina de *C. duckei*	>5000	-
Extrato de *C. duckei*	137,63	0,996

Curva DPPH: y = 0,0103x – 0,0013; R^2 = 0.999

A quimioluminescência com luminol tem sido utilizada como um ensaio sensível para monitoramento de radicais livres, enzimas, células ou sistemas de órgãos e para *screening* de atividade antioxidante (GIROTTI et al., 2000). A quimioluminescência está baseada nas medidas de área sobre o tempo de curso da emissão luminescente na presença do antioxidante. O luminol foi utilizado como detector que é oxidado ao ânion superóxido. A inibição da emissão luminescente causada pela diminuição do ânion superóxido resultou na avaliação do poder antioxidante. Na **Tabela 40** estão apresentados os resultados da contagem de fótons por minuto e a porcentagem de inibição da emissão luminescente dos extratos das folhas *C. oblongifolia* e *C. duckei.* Neste experimento, o extrato de *C. oblongifolia* apresentou um CE_{50} de 0,5264 mg/kg, e o de *C. duckei* de 0,1280 mg/kg.

Tabela 40. Contagem de fótons por minuto,% inibição da emissão luminescente, concentração efetiva máxima (CE_{50}) e dos coeficientes de correlação linear (R^2) dos extratos hidroalcóolico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na avaliação da atividade antioxidante sequestradora do radical superóxido gerado no sistema xantina/xantina oxidase/luminol.

Material vegetal	Concentração final (µg/mL)	Contagem de fótons por minuto	% de inibição (M±DP)	CE_{50} (µg/mL)	R^2
Branco	-	3.45×10^7	-	-	-
Extrato de *C. oblongifolia*	0,19	$3,25 \times 10^7$	5,85±0,29	0,5264	0,994
	0,37	$1,82 \times 10^7$	47,38±4,59		
	0,75	$1,34 \times 10^7$	61,15±0,18		
	1,49	$6,42 \times 10^6$	81,42±0,71		
	2,99	$2,84 \times 10^6$	91,77±0,02		
Extrato de *C. duckei*	0,19	$1,36 \times 10^7$	60,73±2,25	0,1280	0,996
	0,37	$8,56 \times 10^6$	75,25±0,23		
	0,75	$4,57 \times 10^6$	86,79±1,06		
	1,49	$2,20 \times 10^6$	93,64±0,23		
	2,99	$9,80 \times 10^5$	97,17±0,07		

Todos os componentes celulares são alvos das ROS, no entanto, a gema de ovo contém cerca de 5 g de gordura, composta principalmente por ácidos graxos mono e poli-insaturados (DASGUPTA; DE, 2004; SUGINO et al., 1997), que é atingida a princípio, pela existência de dienos conjugados presentes nos ácidos graxos poli-insaturados. Os radicais livres centrados no oxigênio ($HO^{\bullet}$) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico bis-alílico onde há abstração de H, convertendo-o em novo centro de radical livre (iniciação). O radical lipídico formado pode reagir com qualquer estrutura da membrana, porém a reação mais provável é com oxigênio (O_2), gerando o radical lipídio-peroxila (propagação), que pode originar peróxidos cíclicos ou abstrair hidrogênio de outro lipídeo levando desta maneira à continuação da reação de cadeia radicalar. A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompam a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou alcoxila e, desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante (BUEGE; AUST, 1978; YOSHIKAWA et al., 1993).

A peroxidação lipídica pode conduzir a uma desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios que atuam sinergicamente a um aumento das atividades da fosfolipase A2 (PLA2) e da ciclooxigenase-2 (COX-2), resultando em níveis maiores de produção de prostaglandinas (PGs), incluindo a prostaglandina E_2 (PGE_2), responsáveis pela inflamação (BUEGE; AUST, 1978; OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; SZEFEL et al., 2011; YEDGAR; COHEN; SHOSEYOV, 2006).

A peroxidação lipídica pode ser prevenida no estágio inicial por sequestradores de radicais livres e compostos capazes de retirar o oxigênio do estado singleto, ou a propagação da reação em cadeia pode ser quebrada por sequestradores de radical peroxila, alcoxila e quelantes de Fe^{2+}. A peroxidação lipídica pode ser suprimida por substâncias antioxidantes que inativam enzimas envolvidas na formação de ROS, por quelação do Fe^{2+}, por inibição do estágio inicial e/ou acelerando o estágio final (COOK, 1996). Pode-se observar que tanto as oleorresinas quanto os extratos das folhas tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica em cerca de 40-60% nas menores concentrações e acima de 90% nas maiores concentrações testadas. O extrato das folhas de *C. duckei* é mais efetiva, apresentando uma CE_{50} de 0,00115 µg/mL (**Tabela 41**).

Tabela 41. Resultados da % inibição da peroxidação lipídica obtidos pelo pela oleorresina e pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* na avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica sobre gema de ovo

Material vegetal	Concentração final (µg/mL)	% de inibição (M±DP)	CE_{50} (ng/mL)	R^2
Oleorresina de *C. oblongifolia*	$8,69 \times 10^{-03}$	57,30±0,88	9,66	0,991
	$1,74 \times 10^{-02}$	62,85±0,86		
	$3,48 \times 10^{-02}$	76,77±0,02		
	$6,95 \times 10^{-02}$	84,76±0,58		
	$1,39 \times 10^{-01}$	92,01±2,25		
Extrato de *C. oblongifolia*	$8,69 \times 10^{-03}$	44,90±0,86	6,71	0,994
	$1,74 \times 10^{-02}$	67,12±0,52		
	$3,48 \times 10^{-02}$	76,06±1,39		
	$6,95 \times 10^{-02}$	85,84±1,74		
	$1,39 \times 10^{-01}$	90,04±0,68		
Oleorresina de *C. duckei*	$8,69 \times 10^{-03}$	59,30±0,98	6,24	0,988
	$1,74 \times 10^{-02}$	64,92±0,34		
	$3,48 \times 10^{-02}$	74,43±0,98		
	$6,95 \times 10^{-02}$	83,71±0,62		
	$1,39 \times 10^{-01}$	97,46±0,69		
Extrato de *C. duckei*	$8,69 \times 10^{-03}$	43,48±2,25	1,15	0,952
	$1,74 \times 10^{-02}$	59,13±1,00		
	$3,48 \times 10^{-02}$	79,44±0,81		
	$6,95 \times 10^{-02}$	85,24±0,54		
	$1,39 \times 10^{-01}$	99,15±0,59		

5.5.4 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre a inibição do óxido nítrico sintase (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) *in vivo*

Na mucosa gástrica, o óxido nítrico possui um importante papel, regulando a secreção de muco, aumentando o fluxo sanguíneo local, inibindo a neutrofilia e

favorecendo o processo de cicatrização. Seus efeitos no estômago são via guanilato-ciclase, via guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) ou atuando diretamente sobre canais de potássio cálcio-dependentes, hiperpolarizando células endoteliais dos vasos, resultando em vasodilatação (MARTÍN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001; ODABASOGLU et al., 2006; RODRÍGUEZ-TÉLLEZ et al., 2001).

A óxido nítrico sintase é a enzima responsável pela produção de óxido nítrico no estômago. Esta é divida em constitutiva e endotelial (NOSc e NOSe), que são responsáveis pela integridade da mucosa gástrica. O L-NAME (L-metil-arginina-éster) é capaz de bloquear a produção de óxido nítrico por bloquear estas enzimas (KOLIOS; VALATAS; WARD, 2004). A gastroproteção exercida pela oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (**Tabela 42 e Figura 18**), em parte, é perdida com a administração do L-NAME, sugerindo que há mecanismos gastroprotetores dependentes da produção de óxido nítrico.

Grupamentos sulfidrílicos contribuem para a integridade da mucosa gástrica, tendo como primeira finalidade reduzir a formação de radicais livres derivados do oxigênio, relacionando-se com a manutenção da integridade celular, e reduzindo a lesão tecidual (CHATTOPADHYAY et al., 2006).

A redução dos níveis normais de grupos sulfidrílicos torna a mucosa gástrica susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa. A N-etilmaleimida (NEM), é uma substância capaz de quelar as pontes de dissulfeto que são responsáveis pela conformação da barreira mucosa, promovido pelos compostos sulfidrílicos (BASUDHAR et al., 2013; KLEIN-JÚNIOR et al., 2013).

Com a administração do NEM, há potencialização dos danos gástricos induzidos pelo EtOH/HCl, com diminuição da concentração de grupamentos sulfidrílicos na mucosa, em especial da glutationa redutase (GSH). A administração de NEM resulta em lesão tecidual acima do normal, porém, o tratamento com a oleorresina ou com o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* promove atividade gastroprotetora, provavelmente dependente de GSH (**Tabela 42** e **Figura 18**).

Tabela 42. Efeito da administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) da oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* (300 mg/kg) em úlceras gástricas por etanol/HCl associado a inibição da NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.).

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	Tratamento (i.p.)	Área total de lesão (mm²)	Área relativa lesada (%)	Índice de cura (%)
Controle	-	Salina	88.15±4.34	59,57±4.30	-
		L-NAME	81.04±1.03	41.14±4.48	-
		NEM	108.23±2.42	56.65±3.97	-
Carbenoxolona	200	Salina	18.34±4.10	11.95±3.43$^{\#\#\&\&**}$	77.30±5.32$^{\#\#\&\&**}$
		L-NAME	33.83±2.84$^{\#\#\&\&**}$	26.16±4.87$^{\&\&**}$	54.94±3.68$^{\&\&**}$
		NEM	92.77±4.47$^{\&\&**}$	31.21±3.69$^{\&\&**}$	27.86±4.17$^{\&\&**}$
C. oblongifolia Oleorresina	300	Salina	30.10±3.83$^{\#\#\&\&**}$	12.58±3.63$^{\#\#\&\&**}$	69.79±4.56$^{\#\#\&\&**}$
		L-NAME	60.15±3.75$^{\&}$	26.91±4.44$^{\&\&**}$	34.59±3.39$^{\&\&**}$
		NEM	67.05±3.46$^{\&\&}$	34.78±3.09$^{\&\&**}$	29.96±5.40$^{\&\&**}$
C. oblongifolia Extrato	300	Salina	32.88±4.31$^{\#\#\&\&**}$	18.30±2.53$^{\#\#\&\&**}$	60.22±4.58$^{\#\#\&\&**}$
		L-NAME	64.04±3.56$^{\&}$	29.09±3.35$^{\&\&**}$	26.69±4.22$^{\&\&**}$
		NEM	68.18±3.35$^{\&\&}$	37.57±2.38$^{\&**}$	27.20±3.77$^{\&**}$
C. duckei Oleorresina	300	Salina	30.42±4.05$^{\#\#\&\&**}$	13.38±4.47$^{\#\#\&\&**}$	69.25±2.90$^{\#\#\&\&**}$
		L-NAME	65.60±3.97$^{\&}$	29.22±1.13$^{\&\&**}$	28.16±4.85$^{\&\&**}$
		NEM	65.16±4.90$^{\&\&}$	34.83±3.22$^{\&\&**}$	26.79±4.27$^{\&\&**}$
C. duckei Extrato	300	Salina	31.26±2.86$^{\#\#\&\&**}$	18.14±4.42$^{\#\#\&\&**}$	58.23±5.51$^{\#\#\&\&**}$
		L-NAME	56.87±4.41$^{\&}$	31.76±3.91$^{\&\&**}$	23.31±4.40$^{\&\&**}$
		NEM	65.69±4.24$^{\&\&}$	36.20±2.98$^{\&**}$	24.45±4.38$^{\&**}$

Os dados representam a média±E.P.M. (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo controle salina ($^{*}p$<0,05 e $^{**}p$<0,01), grupo controle L-NAME ($^{\#}p$<0,05 e $^{\#\#}p$<0,01) e grupo controle L-NAME ($^{\&}p$<0,05 e $^{\&\&}p$<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

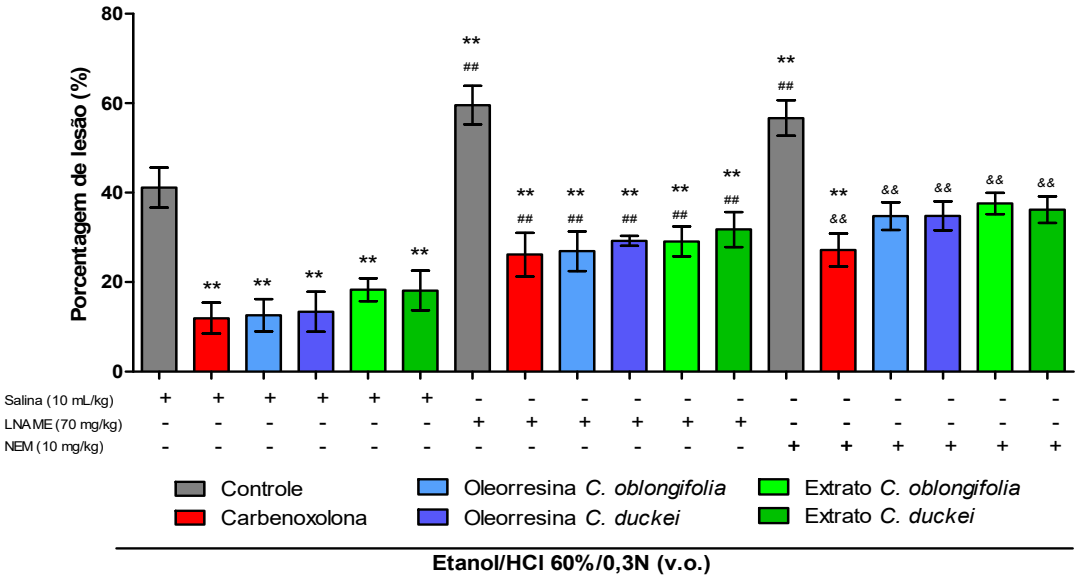


Figura 18. Gráfico do efeito da administração oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o. e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o., sobre a porcentagem de lesão de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCl (60%/0,03N), associado a inibição da NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle salina ($^{*}p$<0,05 e $^{**}p$<0,01), grupo controle L-NAME ($^{\#}p$<0,05 e $^{\#\#}p$<0,01) e grupo controle L-NAME ($^{\&}p$<0,05 e $^{\&\&}p$<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

5.5.5 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre a atividade da glutationa S- transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e níveis de óxido nítrico (NO) na região glandular gástrica

A gastroproteção pode estar relacionada com a manutenção da integridade da mucosa gástrica, que depende da integridade da microcirculação, secreção de muco e atividade de enzimas antioxidantes (KWIECIEŃ et al., 2004). Mecanismos antioxidantes são eventos fisiológicos normais, mas resultam peroxidação lipídica e dano oxidativo em condições patológicas. A primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica é a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de ser menos nocivo, ainda causa danos celulares. O H_2O_2 é reduzido pela enzima glutationa peroxidase (GPx) em água. Esta reação é acompanhada pela conversão da glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG), sendo convertida novamente em GSH pela glutationa redutase (GR) (KWIECIEŃ et al., 2004; SANTOS et al., 2009, 2012).

Como citado anteriormente, membranas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, e possuem um arsenal complexo de enzimas redutoras contra espécies reativas de oxigênio (ROS), evitando assim a lipoperoxidação lipídica. Uma dessas enzimas é a catalase, que atua decompondo o peróxido de hidrogênio, proveniente da peroxidação dos ácidos graxos em água (BUEGE; AUST, 1978; CHATTOPADHYAY et al., 2006; FREITAS et al., 2011; OZBAYER et al., 2014; ZHENG et al., 2014).

Essas alterações na dinâmica antioxidante no tecido estomacal favorecem ao aparecimento de lesões gástricas. Determinar as atividades da SOD, da GSH, da CAT e a participação do NO são importantes na determinação do mecanismo de ação gastroprotetor (GUPTA; RAO, 2014; GUPTA; RAO; SHARMA, 2013). A administração da oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei* não resulta em aumento da produção da enzima superóxido dismutase, enquanto que a administração do extrato das folhas mantém os níveis desta enzima próximos aos normais (**Figura 19**).

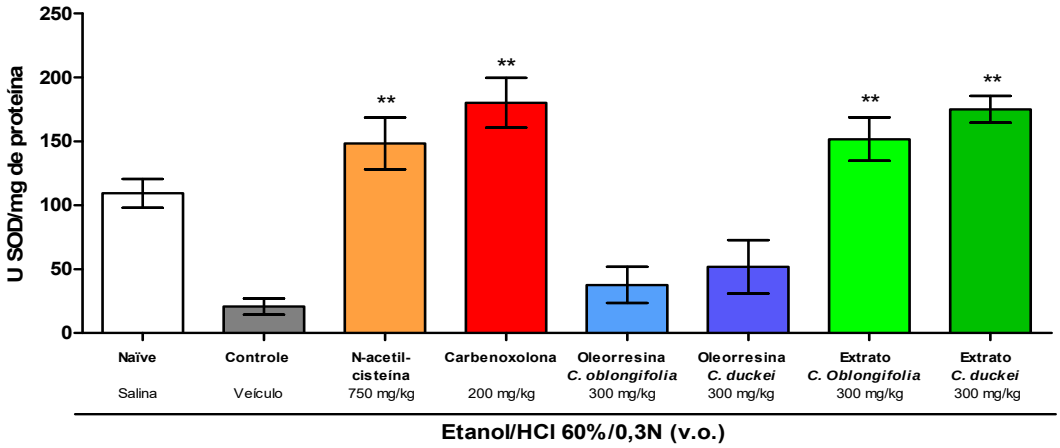


Figura 19. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração da enzima superóxido dismutase de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

De maneira similar, a enzima catalase também não está aumentada em nenhum dos tratamentos, encontrando-se ligeiramente aumentada com a administração do extrato das folhas (não significativo) (**Figura 20**).

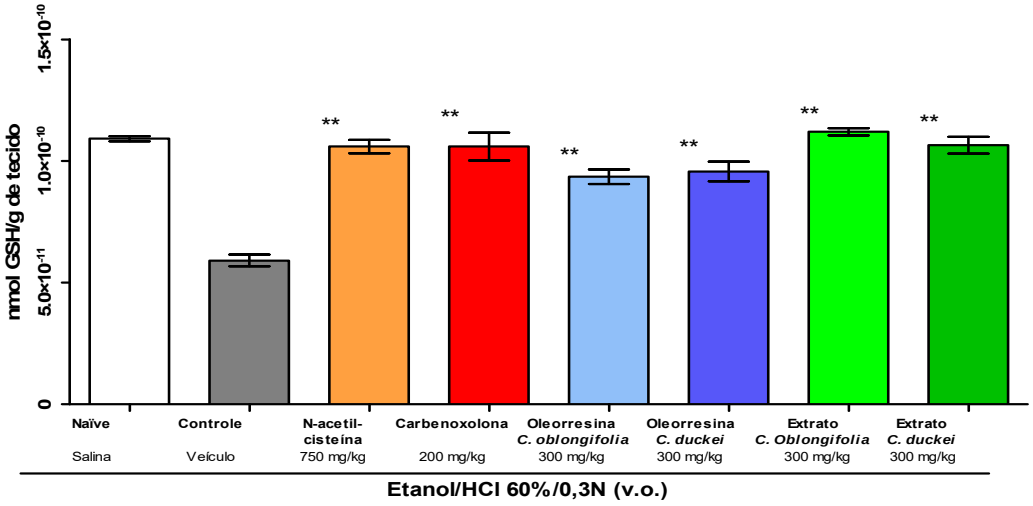


Figura 20. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração de glutationa de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

A enzima GSH manteve-se próximo dos níveis normais em todos os tratamentos (**Figura 21**)., sendo pouco depletada no tratamento com a oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei.*

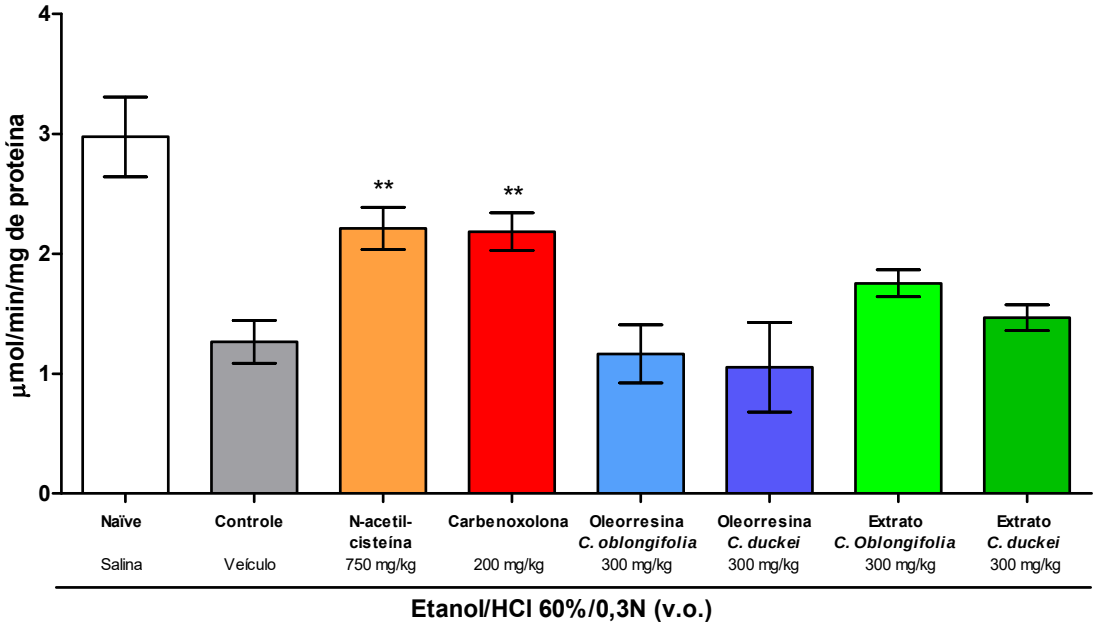


Figura 21. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração de catalase de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

O NO encontra-se em concentrações maiores no tratamento com os extratos de *C. oblongifolia* e *C. duckei* do que na administração das oleorresinas (**Figura 22**). Ao que parece, os compostos presentes no extrato promovem ação antioxidante mais pronunciada, favorecendo a gastroproteção por este mecanismo, enquanto que a gastroproteção promovida pela oleorresina parece interferir em mecanismos anti-inflamatórios, ou talvez, interferir na secreção de HCl por inibição da enzima H^+, K^+ ATPase.

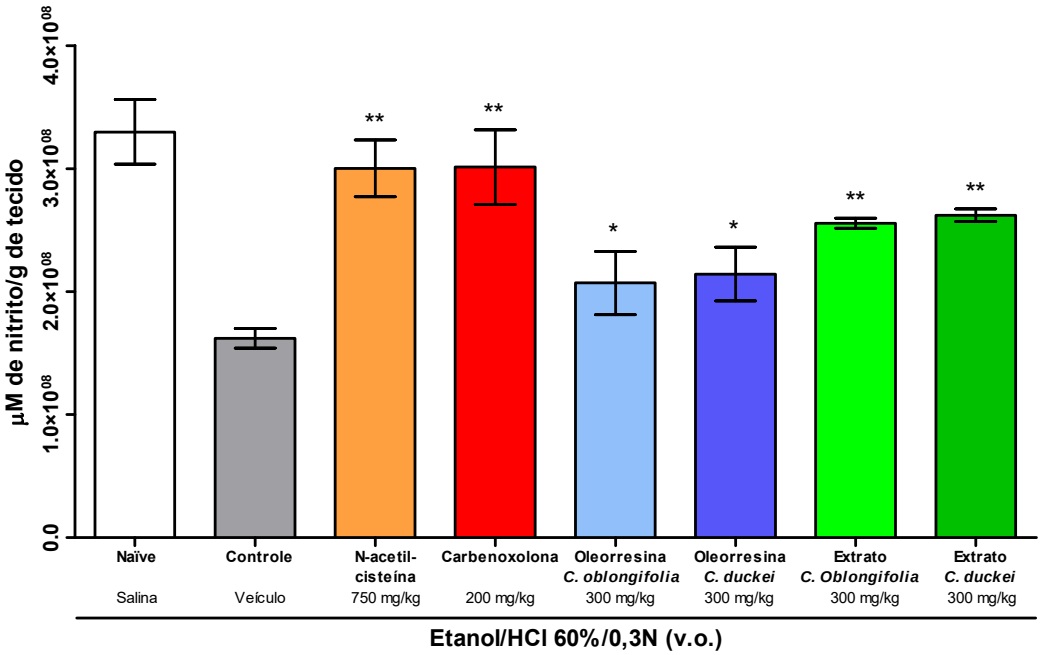


Figura 22. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração de nitrito de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

5.5.6 Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na região glandular gástrica

A mieloperoxidase (MPO, peróxido de hidrogênio oxidoredutase) é uma enzima amplamente distribuída no organismo e suas fontes fundamentais são os leucócitos (neutrófilos, monócitos e os macrófagos), apesar de ter sido isolada de muitos fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial e sêmen, entre outros) E também em diferentes tecidos (coração, rins, pele, fígado e placenta) (EDWARDS et al., 1988; NADEEM; MASOOD; SIDDIQUI, 2008; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009). No entanto, a fonte mais comum são os neutrófilos, onde a enzima se encontra localizada a nível lisossomal. Constituindo de 2-5% do conteúdo de proteínas destas células (MARQUEZ; DUNFORD; VAN WART, 1990).

O sistema MPO-peróxido de hidrogênio (H_2O_2)-ferro tem sido um sistema bem estudado. A reação da MPO com o H_2O_2 proveniente das células fagocitárias ativadas por partículas estranhas, formando um complexo enzima-substrato com uma forte

capacidade oxidativa. Este complexo se combina com o ferro, geralmente cloroso, que se oxida para formar o ácido hipocloroso (HOCl). O ácido hipocloroso é um potente agente oxidativo que contribui com o mecanismo de defesa contra os agentes infecciosos, mas também pode atuar sobre as células do hospedeiro. O HOCl pode causar muitos danos em enfermidades inflamatórias (KETTLE et al., 1992).

O aumento da atividade da MPO é relatado em vários processos patológicos e está associado com o aumento do estresse oxidativo, como no caso das enfermidades infecciosas, inflamatórias e isquemia-reperfusão. Nestes casos se demonstrou um aumento significativo da atividade da mieloperoxidase, em proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, portanto, se pode utilizar sua atividade como índice de migração leucocitária e de estresse oxidativo (MADAMANCHI; VENDROV; RUNGE, 2005; MALLE; BUCH; GRONE, 2003; MØLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996; NAHRENDORF et al., 2008; SMITH, 1994).

A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa gástrica, sendo importante fonte de ROS na mucosa gástrica. A enzima MPO, presente nos neutrófilos, atua na presença do ânion superóxido ($O2^{\bullet-}$) e do ânion cloreto (Cl^-) para formar o ácido hipoclorídrico, o qual apresenta ação tóxica, acabado por ser lesivo para as células do tecido. Dessa maneira, sugere-se que a diminuição da infiltração de neutrófilos em tecidos ulcerados resultaria na melhora da úlcera gástrica, por haver redução da formação de ROS dependente de neutrófilos (SAKURAI; OSAKA; YAMASAKI, 2005).

Os resultados demonstram que a enzima MPO está reduzida nos animais tratados com o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, confirmando os resultados anteriores, onde o mecanismo de ação gastroprotetor dos extratos é mediado pela manutenção das defesas antioxidantes, e que o tratamento da oleorresina de *C. oblongifolia* ou *C. duckei* promove efeito gastroprotetor ainda não em compreendido (**Figura 23**).

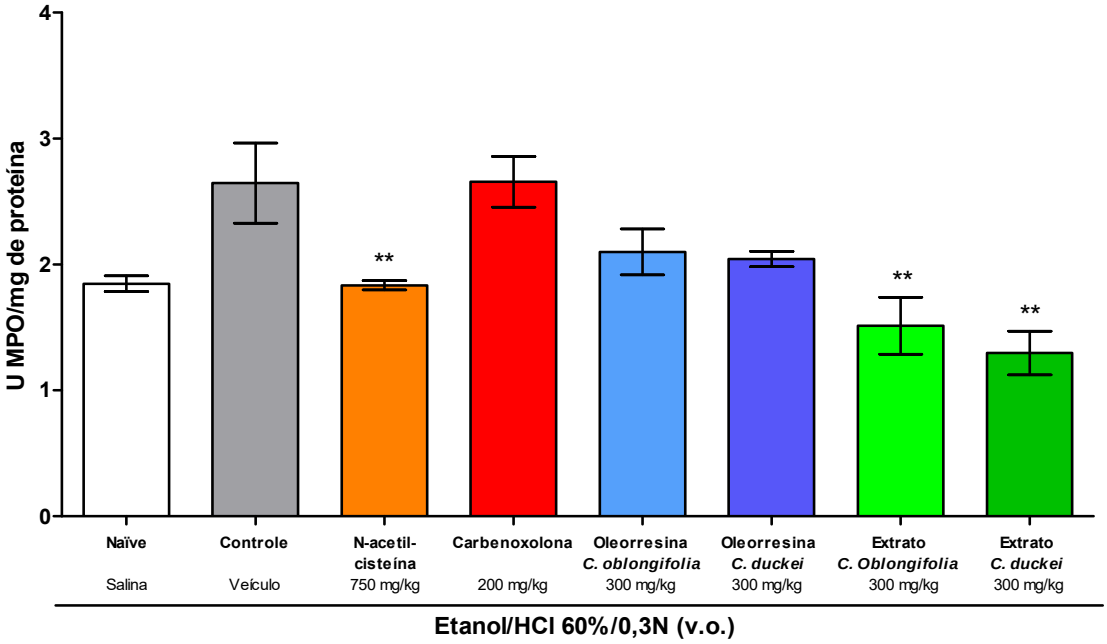


Figura 23. Gráfico do efeito da administração da oleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, v.o., N-acetilcisteína, na dose de 750 mg/kg, v.o., e carbenoxolona, na dose de 200 mg/kg, v.o sobre a concentração da enzima mieloperoxidase de homogenatos de úlceras gástricas induzidas EtOH/HCl (60%/0,03N) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

5.5.7 Efeito das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. sobre a atividade da enzima H^+, K^+-ATPase

Conforme representado nas **Figuras 24** e **25**, as oleorresinas e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* foram capazes de inibir a atividade da enzima H^+, K^+-ATPase *in vitro*, de maneira dose-dependente, sendo mais efetivo na concentração de 1000 µg/mL. O controle positivo omeprazol, como esperado, na concentração de 345 µg/mL inibiu a enzima, sendo a ouabaína (728 µg/mL) também não inibiu a enzima, uma vez que é um inibidor específico da enzima Na^+, K^+-ATPase. Esta técnica permite detectar a atividade farmacológica sobre células parietais secretoras de HCl através da enzima H^+, K^+ ATPase (JAINU; DEVI, 2006).

Os efeitos anti-secretores de ácido previamente avaliados nas oleorresinas e extratos das folhas *in vivo* apresentados neste trabalho, foi confirmado *in vitro* através da inibição da atividade da enzima H^+, K^+-ATPase. Além disso, diversos trabalhos na literatura demonstram as atividades gastroprotetoras das oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. Estas atividades podem estar relacionadas com a presença

de terpenos, nas oleorresinas, e compostos fenólicos, nos extratos das folhas (ADZU et al., 2015; LEMOS et al., 2015; PAIVA et al., 1998).

A inibição da atividade da bomba de prótons está envolvida significativamente na redução da secreção gástrica, sendo o principal alvo farmacológico da terapia gastroprotetora (KONTUREK et al., 2005; NISHIOKA; NAGAO; URUSHIDANI, 1999).

A ativação da enzima H^+, K^+-ATPase é um processo complexo, que envolve diversos tipos celulares responsivos a hormônios e mediadores específicos, os quais resultam na secreção de HCl (HORN, 2000), que, combinado com outros hormônios, tais como o pepsinogênio e a gastrina, são responsáveis pela digestão de proteínas, absorção de ferro, cálcio e vitamina B_{12}, além de prevenir o crescimento bacteriano no estômago. Estes eventos são originados nas células parietais, ECL, G e D, sendo regulados por mecanismos centrais, periféricos e intracelulares (CHU; SCHUBERT, 2012; HOU; SCHUBERT, 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008; SCHUBERT, 2010).

A enzima H^+, K^+-ATPase está localizada nos canalículos e em túbulo-vesiculares da membrana apical da célula parietal, que reveste o lúmen das glândulas gástricas do lado apical, e o fluído intersticial através da membrana basolateral. Sua função é bombear H^+ contra um gradiente de concentração (BARRETT et al., 2012).

A célula parietal tem a membrana apical revestindo e a membrana basolateral em contato com o fluido intersticial. Os canalículos se estendem desde a membrana apical para dentro da célula. As células contêm também estruturas túbulo-vesiculares com moléculas da H^+, K^+-ATPase nas paredes (MULLIN et al., 2009; SANDVIK; BRENNA; WALDUM, 1997; SCHUBERT; PEURA, 2008).

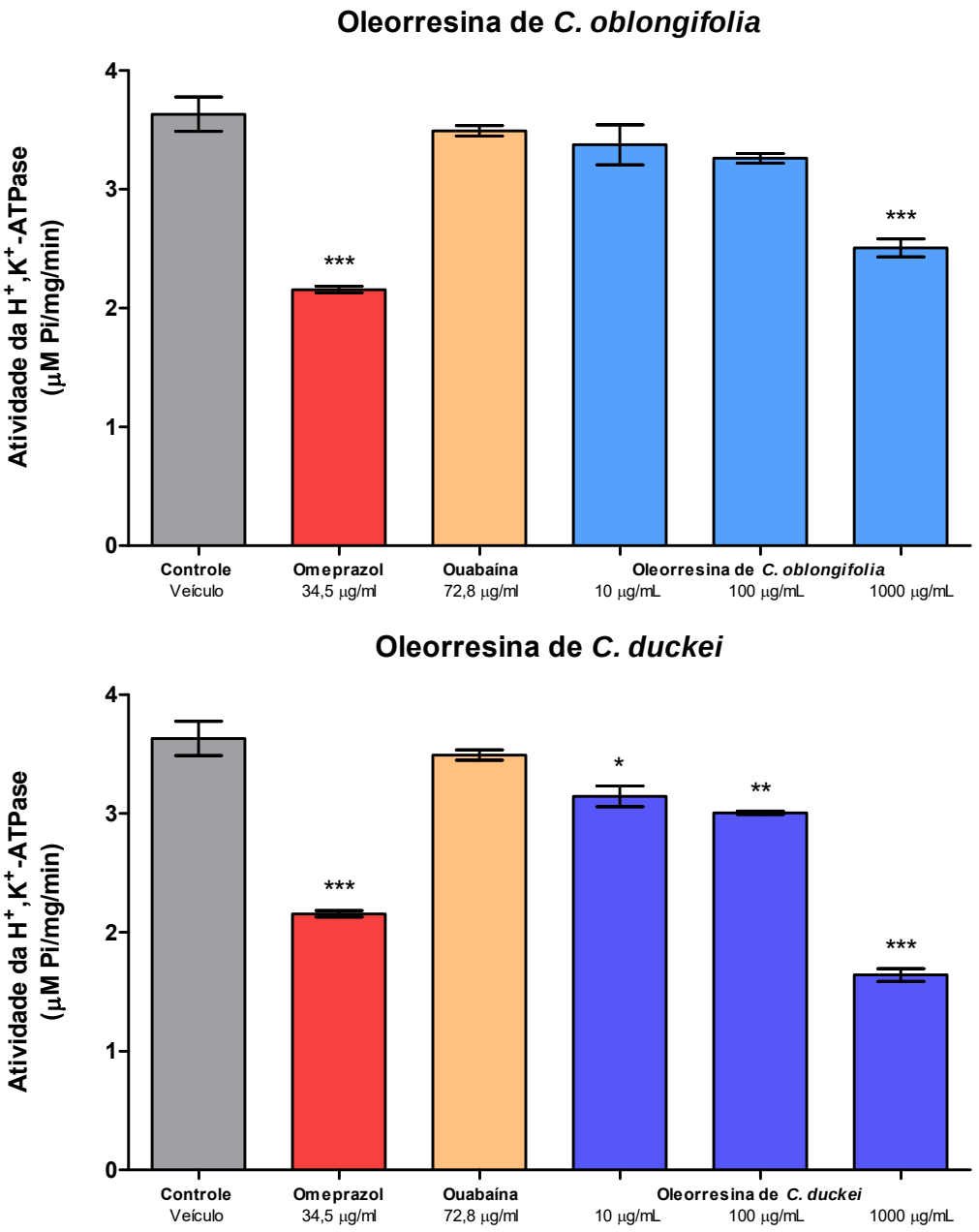
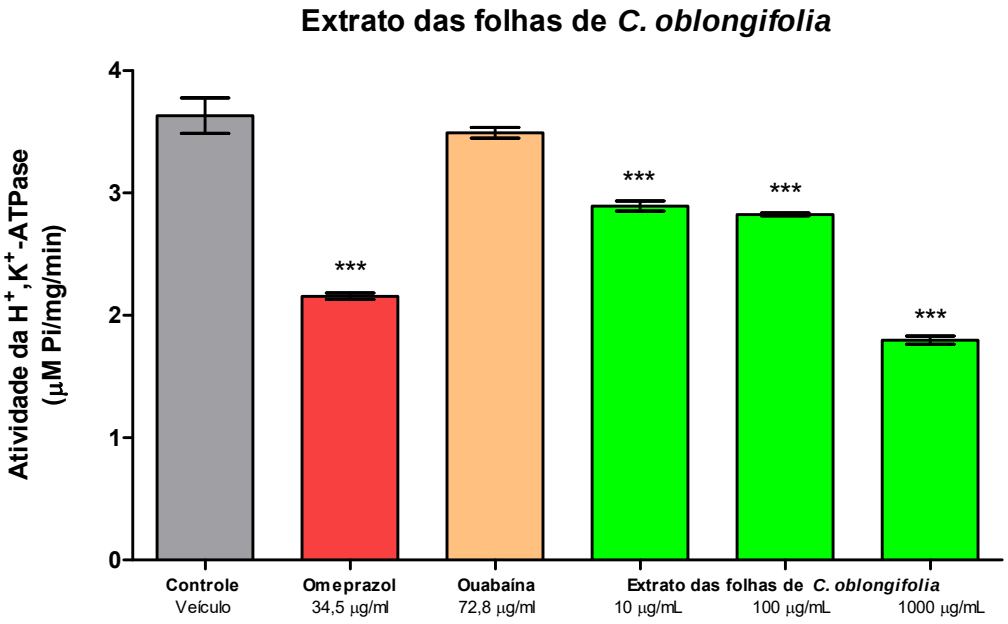


Figura 24. Gráfico do efeito do tratamento com a oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na concentração de 10, 100 e 1000 µg/mL, do omeprazol, 34,5 µg/mL e da oubaína, 72,8 µg/mL sobre a sobre a atividade da enzima H^+K^+ ATPase. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.



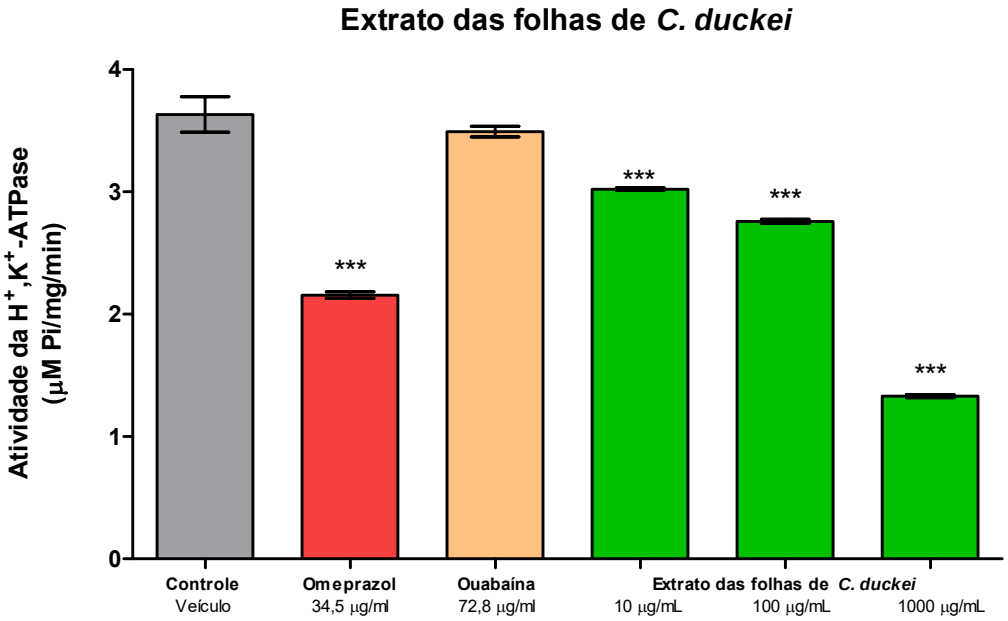


Figura 25. Gráfico do efeito do tratamento com os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na concentração de 10, 100 e 1000 µg/mL, do omeprazol, 34,5 µg/mL e da oubaína, 72,8 µg/mL sobre a sobre a atividade da enzima H^+K^+ ATPase. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

Quando estimuladas, as células parietais direcionam os túbulo-vesiculares para a membrana apical inserindo muitas moléculas da enzima H^+, K^+-ATPase na membrana. A secreção de HCl ocorre com a secreção de H^+ para o lúmen gástrico,

trocando-o por K^+. O Cl^- é transportado através de canais ativados por AMPc. Ocorre dissociação de H_2CO_3 em HCO_3, que expelido através de sistema antiporte na membrana basolateral das células parietais, trocado por outro ânion, em geral, o Cl^- (BARRETT et al., 2012; HOU; SCHUBERT, 2006).

Ocorrem interações entre outros receptores tais como H_2, CCK-2 e M_3. Os receptores H_2 de histamina aumentam AMPc, via proteína Gs, os receptores CCK-2 de gastrina e os receptores colinérgicos M_3 aumentam os níveis intracelulares de cálcio. A ativação de um tipo de receptor estimula e potencializa a resposta de outro. A ativação de receptores EP3, via proteína Gi ocorre através de prostaglandinas, principalmente PGE_2, que inibe a secreção gástrica (BARRETT et al., 2012; HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; TAKEUCHI et al., 1999; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Assim, a acetilcolina, a gastrina e a histamina (mediadores endógenos) podem estimular a célula parietal, ativando a enzima H^+-K^+-ATPase, resultando em secreção de HCl através do efluxo de prótons (H^+) (KONTUREK et al., 2005; SÁNCHEZ-FAYOS CALABUIG; MARTÍN RELLOSO; PORRES CUBERO, 2009).

Além disso, o NO formado também pode estar inibindo a bomba de prótons, já que existe uma correlação entre o aumento de NO e a inibição da H^+-K^+-ATPase (BULUT et al., 1999).

O conjunto de resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da atividade gastroprotetora sugerem que os metabólitos secundários presentes na oleorresina e extrato das folhas de *Copaifera* são capazes de promover a proteção da mucosa gástrica através de mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e por inibir a secreção ácida gástrica através da inibição da bomba de prótons (H^+, K^+-ATPase) (NISHIOKA; NAGAO; URUSHIDANI, 1999), promovendo a citoproteção e facilitando o processo de regeneração tecidual.

5.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva

5.6.1 Efeito das oleorresinas, extratos das folhas de *Copaifera* spp. e do ácido poliáltico sobre atividade sob o sistema nervoso central

A fim de investigar um possível efeito depressor, sedativo ou miorelaxante central das oleorresinas e dos extratos em camundongos (o que poderia interferir nos testes antinociceptivos), foram realizados testes de atividade sobre o sistema nervoso: *rota rod* e campo aberto.

O modelo de campo aberto visa investigar a possível influência de substâncias sobre o SNC dos animais. Especificamente, avalia os efeitos depressores, ansiolíticos ou ansiogênicos, sendo o teste de ansiedade mais utilizado no mundo. Na prática experimental é utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória, podendo também ser empregado para avaliação da ansiedade (VIANNA et al., 2001). Os efeitos de diferentes fármacos têm sido investigados neste modelo, incluindo substâncias com efeitos ansiolíticos como benzodiazepínicos, mas também substâncias estimulantes como a anfetamina ou cocaína e até sedativos tais como os neurolépticos. Um aumento da locomoção pode ser considerado um efeito estimulante enquanto que a diminuição está relacionada à sedação ou prejuízo motor (WILLNER, 1984).

Conforme observado na **Figura 26**, somente o controle positivo, o fármaco diazepam alterou a atividade locomotora dos animais. Tanto as oleorresinas, quanto os extratos das folhas de *Copaifera* spp. não exerceram qualquer alteração na atividade locomotora dos animais avaliados, ou seja, nos dois parâmetros comportamentais estudados, o número de cruzamentos (*crossings*) e da atividade exploratória vertical (*rearings*) não foram reduzidos com os tratamentos.

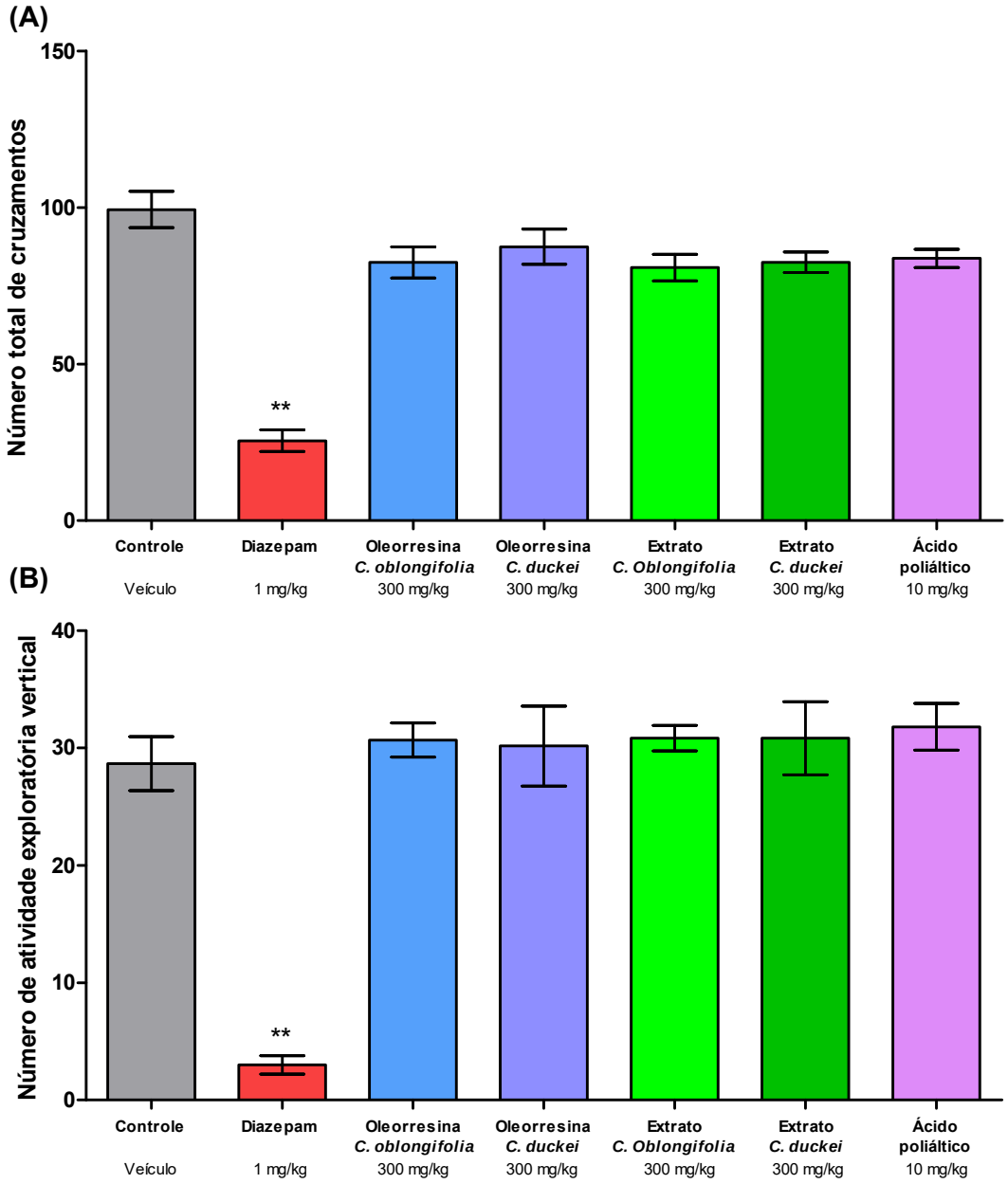


Figura 26. Gráfico do efeito da administração das oleorresinas e dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, e do ácido poliáltico, na dose de 10 mg/kg, v. o., e do diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., sobre a atividade locomotora em camundongos. **(A)** Exploração horizontal – *crossings*. **(B)** Exploração vertical – *rearings*. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

Com o objetivo de avaliar se o pré-tratamento com as oleorresinas ou com os extratos das folhas das *Copaiferas* provocavam alterações no desempenho motor dos animais, os mesmos foram avaliados no teste do *Rota Rod*, o qual possibilita a observação de alterações no equilíbrio e na coordenação motora. Como demonstrado

na **Figura 27**, apenas o tratamento com o diazepam alterou o equilíbrio e coordenação motora dos animais em comparação com o grupo controle.

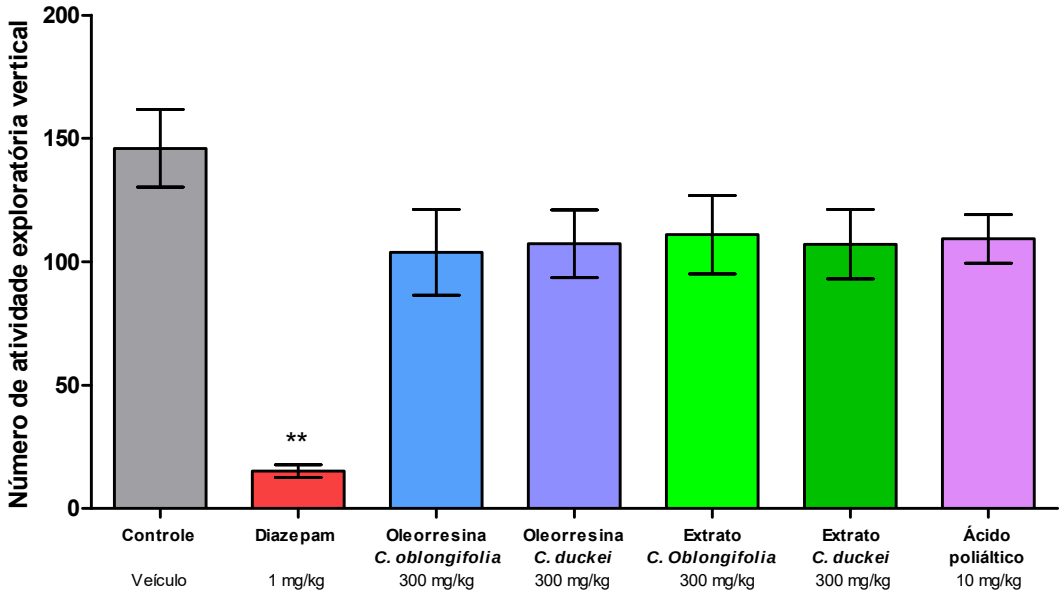


Figura 27. Gráfico do efeito da administração das oleorresinas e dos extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, na dose de 300 mg/kg, e do ácido poliáltico, na dose de 10 mg/kg, v. o., e do diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., sobre a coordenação locomotora em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Estes experimentos são de importância na avaliação de atividades antinociceptivas de novas substâncias, pois através do estudo farmacológico das alterações comportamentais, tais como redução da capacidade motora dos animais, sedação, aumento da temperatura corpórea, dentre outras alterações, pode-se avaliar se há resposta falso-positiva para a atividade analgésica. Sendo assim, uma modificação na performance motora que o animal possa vir a sofrer, em decorrência de uma ação miorelaxante ou sedativa, pode induzir a um grande número de erros em estudos sobre fármacos que atuam na nocicepção (central e periférica) (MILLAN, 1999, 2002).

5.6.2 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre contorções abdominais

O método de contorções abdominais induzido por ácido acético foi utilizado para *screening* da atividade analgésica (COLLIER et al., 1968; KOSTER; ANDERSON; DEBEER, 1959). Este método consiste na administração do ácido acético na membrana serosa presente no peritônio dos animais, o qual é um agente irritante, resultando no comportamento esteriotipado em camundongos e ratos, evidenciando dor visceral através das contorções e da falta de coordenação motora (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Avalia-se a ação antinociceptiva por dor neurogênica periférica, dor neurogênica central ou dor induzida por liberação de mediadores inflamatórios de maneira não específica (CERVERO; LAIRD, 1999; FARRELL; CALLISTER; KEELY, 2014; FOREMAN, 2004; SHAFIEE et al., 2003), como a liberação de PGE2 e PGF2α, histamina, bradicinina, serotonina, substância P, IL-1β e TNF-α, estimulando diretamente os nociceptores quimiosensíveis (BAGDAS et al., 2016; FRANÇA et al., 2001; GUO et al., 2008), ou seja, envolvendo assim muitos mediadores e vias de ativação não específicas, sendo por este motivo escolhido como modelo de triagem para a investigação de atividades antinociceptivas (STEPANOVIĆ-PETROVIĆ et al., 2008; WILLAIN-FILHO et al., 2008; ZANBOORI; TAMADDONFARD; MOJTAHEDEIN, 2008).

De acordo com os resultados obtidos neste ensaio, observa-se que a oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 mg/kg, reduziu de (**$p<0,01$ e ***$p<0,001$) maneira dose-dependente as contorções abdominais induzidas por ácido acético quando comparado com o grupo controle negativo (**Figura 28**).

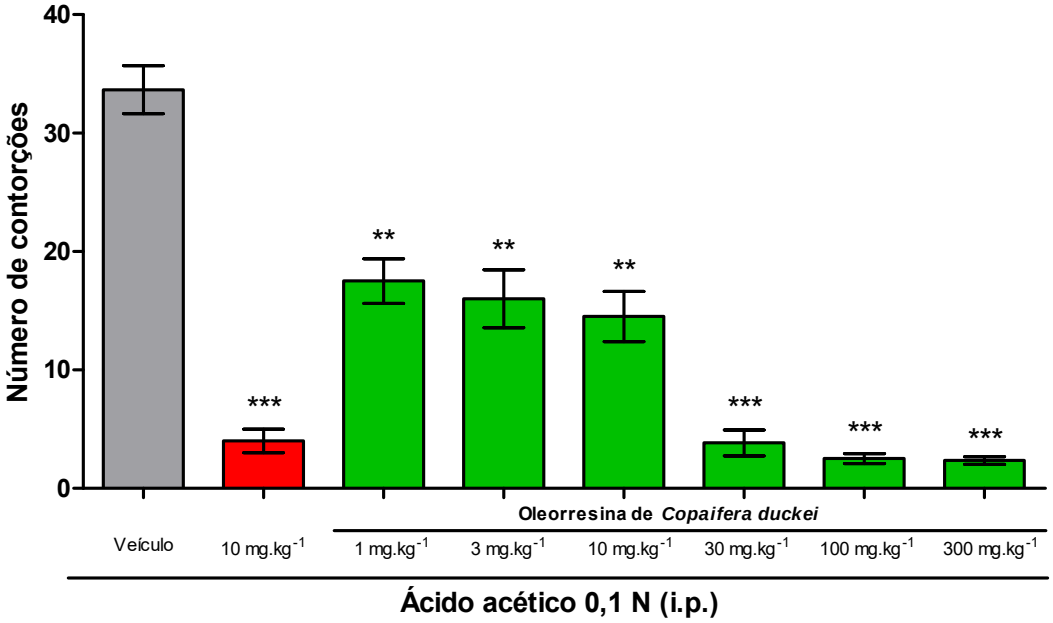
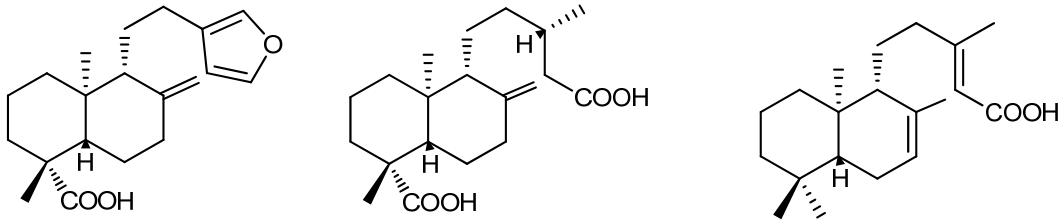


Figura 28. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 mg/kg, *v.o.* e indometacina, na dose de 10 mg/kg, *v.o.*, sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de animal, i. p.) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

As inibições máximas calculadas foram de 48±9%; 52±8%, 57±5%, 89±8%; 93±3%, 94±2%, para as doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente, O controle positivo indometacina (10 mg/kg) reduziu de forma significativa (***p<0,001), com inibição máxima de 88±9%. A DI_{50} (dose que inibe 50% da resposta) calculada para o tratamento com a oleorresina de *C. duckei* foi de 16,06 mg/kg ("9,764 - 26,42"; R^2: 0,876).

De acordo com o estudo fitoquímico realizado em nosso grupo de pesquisa, o componente majoritário da oleorresina de *C. duckei* é o ácido *ent*-poliáltico, um diterpeno ácido da classe dos furanos, seguido dos ácido diidro *ent*-agático e do ácido *ent*-copálico (**Figura 29**) (ATOLANI; OLATUNJI, 2014).



1- ácido *ent*-poliáltico **2-** ácido diidro *ent*-agático **3-** isômero do ácido *ent*-copálico

Figura 29. Estruturas químicas isoladas e identificadas como componentes majoritários da oleorresina de *C. duckei.*

Esta substância foi isolada e testada no ensaio de contorções abdominais por ácido acético, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg (**Figura 30**). As inibições máximas calculadas foram de 79±10%; 86±3%, 96±2%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg, respectivamente, O controle positivo indometacina (10 mg/kg) reduziu de forma significativa (***p<0,001), com inibição máxima de 79±8%. A DI_{50} calculada para o tratamento com o ácido poliáltico foi de 0,03215 mg/kg ("0,001131 - 0,9138"; R^2: 0,833).

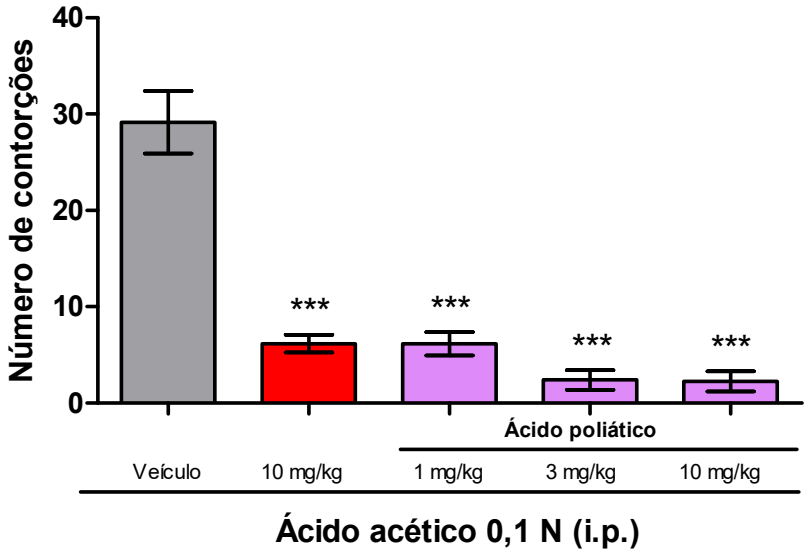


Figura 30. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, *v.o.* e indometacina, na dose de 10 mg/kg, *v.o.*, sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de animal, *i. p.*) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Com base nesses resultados, pode-se inferir que a oleorresina de *C. duckei* apresenta atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais por ácido

acético, e que essa atividade pode estar associada ao seu componente majoritário, o ácido poliáltico.

A partir destes resultados, destaca-se que tanto a oleoresina de *C. duckei* quanto o ácido poliáltico foram mais eficientes em inibir as contorções que o controle positivo (indometacina). Comparando esses resultados com os dados presentes na literatura, Gomes e colaboradores (2010 e 2007) demonstram que as oleorresina de *C. multijuga* e *C. reticula* possuem atividades frente ao modelo estudado. A dose ideal é de 30 mg/kg, com a observação de efeito de platô acima das doses de 100 mg/kg. Outro resultado que merece atenção é aquele obtido no estudo da atividade antinociceptiva realizada por Carvalho e colaboradores (2005), que investigaram de maneira preliminar o efeito antinociceptivo da oleorresina de *C. duckei*. Neste estudo os autores demonstram que doses de 517 mg/kg, 1035 mg/kg e 1802 mg/kg possuem índices de inibição de 48%, 56% e 65% para o ensaio de contorções abdominais por ácido acético. Esses resultados comprovam o efeito antinociceptivo da oleorresina de *C. duckei,* porém em dose muito maior do que no presente estudo. Esta diferença de atividade pode estar relacionada com a diferença na concentração de sesquiterpenos e diterpenos. A oleorresina estudada anteriormente possui 63,6% de sesquiterpenos e 36,4% de diterpenos ácidos. A oleorresina coletada pelo nosso grupo de pesquisa apresenta um teor de mais de 50% de diterpenos ácidos (*dados não publicados*).

Os metabólitos secundários são sintetizados por diferentes vias bioquímicas que são fortemente influênciadas por fatores ambientais e herbivoria. Esses fatores abióticos, tais como clima e solo, e bióticos, tais como herbivoria e alelopatia, resultam em variações no acúmulo e biossíntese dos metabólitos. Alterações nas concentrações de metabólitos secundários induzem variações das respostas farmacológicas em estudo, tais como observadas neste experimento em comparação com o estudo de Carvalho e colaboradores (2005) (AKULA; RAVISHANKAR, 2011; PAVARINI et al., 2012; SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016; SCOGNAMIGLIO et al., 2015; SHULAEV et al., 2008).

Estes resultados demonstram que os diterpenos ácidos podem possuir atividades antinociceptivas mais potentes quando comparadas com os sesquiterpenos.

Em outros estudos, a atividade antiedematogênica de oleorresinas de *Copaifera* spp. foi demonstrada (VEIGA-JÚNIOR et al., 2001; VEIGA-JUNIOR et al., 2006; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). A atividade antinociceptiva da oleorresina ou do

ácido poliáltico pode estar relacionada com a redução na liberação mediadores inflamatórios, diminuindo assim o efeito nos nociceptores, resultando no efeito antinociceptivo periférico. Outra possibilidade poderia ser o bloqueio no sistema de eicosanóides. Nesta situação as substâncias presentes nas óleorresinas de *Copaifera* spp. podem inibir a FLA_2, diminuindo toda a cascata da inflamção (COX-1, COX-2 e 5-LOX) (GOMES et al., 2010; VEIGA-JÚNIOR et al., 2006).

Com a inibição destas enzimas, ocorre a diminuição da liberação de mediadores pro-inflamatórios, como por exemplo TNF-α; IL-β; IL-6, além de diminuir a PGE2. As prostaglandinas, especialmente a PGE2 amplificam o mecanismo nociceptivo e aumentam a permeabilidade vascular enquanto os leucotrienos contraem a musculatura lisa dos vasos sanguíneos, melhoraram a permeabilidade vascular pró-inflamatória mediada (MIGUEL, 2010). Sendo assim, quando ocorre inibição da cascata, todos os eventos subsequentes são inibidos também, resultando na resposta antinociceptiva.

5.6.3 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre a nocicepção espontânea produzida por formalina

O modelo de nocicepção espontânea produzida por formalina consiste na injeção intraplantar de uma solução a base de formol, induzindo o animal a comportamentos típicos como lamber, e/ou morder a pata injetada (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985).

A principal característica desse teste é o fato de que o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção, que parecem envolver estímulos distintos. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e estende-se pelos primeiros cinco minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte das fibras do tipo A, associada a liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, entre outros. A segunda fase ocorre entre 15 - 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995; BELLEZZA et al., 2013; TJØLSEN et al., 1992; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001).

A divisão do ensaio em duas fases permite observar os diferentes efeitos produzidos pela substância em teste, por exemplo, fármacos opióides possuem ação central e inibem as duas fases similarmente, pois a segunda fase do experimento é dependente da primeira. Todavia, os fármacos que possuem ação analgésica, mas que não são opióides, como o paracetamol, a dipirona e os anti-inflamatórios não esteroidais produzem efeitos em ambas as fases, com acentuada diminuição da resposta na segunda fase, mesmo com pequenas doses (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; TJØLSEN et al., 1992).

Neste ensaio, tanto a oleorresina de *C. duckei* quanto o ácido poliáltico reduziram de maneira significativa o tempo de resposta dos animais à formalina (**Figura 31** e **32**).

Na primeira fase do ensaio (fase neurogênica), a oleorresina reduziu a resposta de forma dose-dependente (**Figura 31**), sendo que as porcentagens de inibição para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg foram de 61±12%, 77±10% e 97±5%, respectivamente. A indometacina (10 mg/kg) apresentou uma inibição máxima de 62±13% e a morfina (5 mg/kg) de 96±3%.

Na segunda fase do ensaio (fase inflamatória induzida pela formalina), as mesmas doses apresentaram inibições de 55±7%, 67±4% e 93±1%, respectivamente. A indometacina inibiu de forma significativa com inibição máxima de 66±8%. A morfina por sua vez apresentou inibição de 87±2%.

A DI_{50} calculada na primeira fase para o tratamento com a oleorresina de *C. duckei* foi de 0,3722 mg/kg ("0,0492 - 2,815"; R^2: 0,927), e na segunda fase foi 1,827 mg/kg ("1,026 – 3,255"; R^2: 0,853).

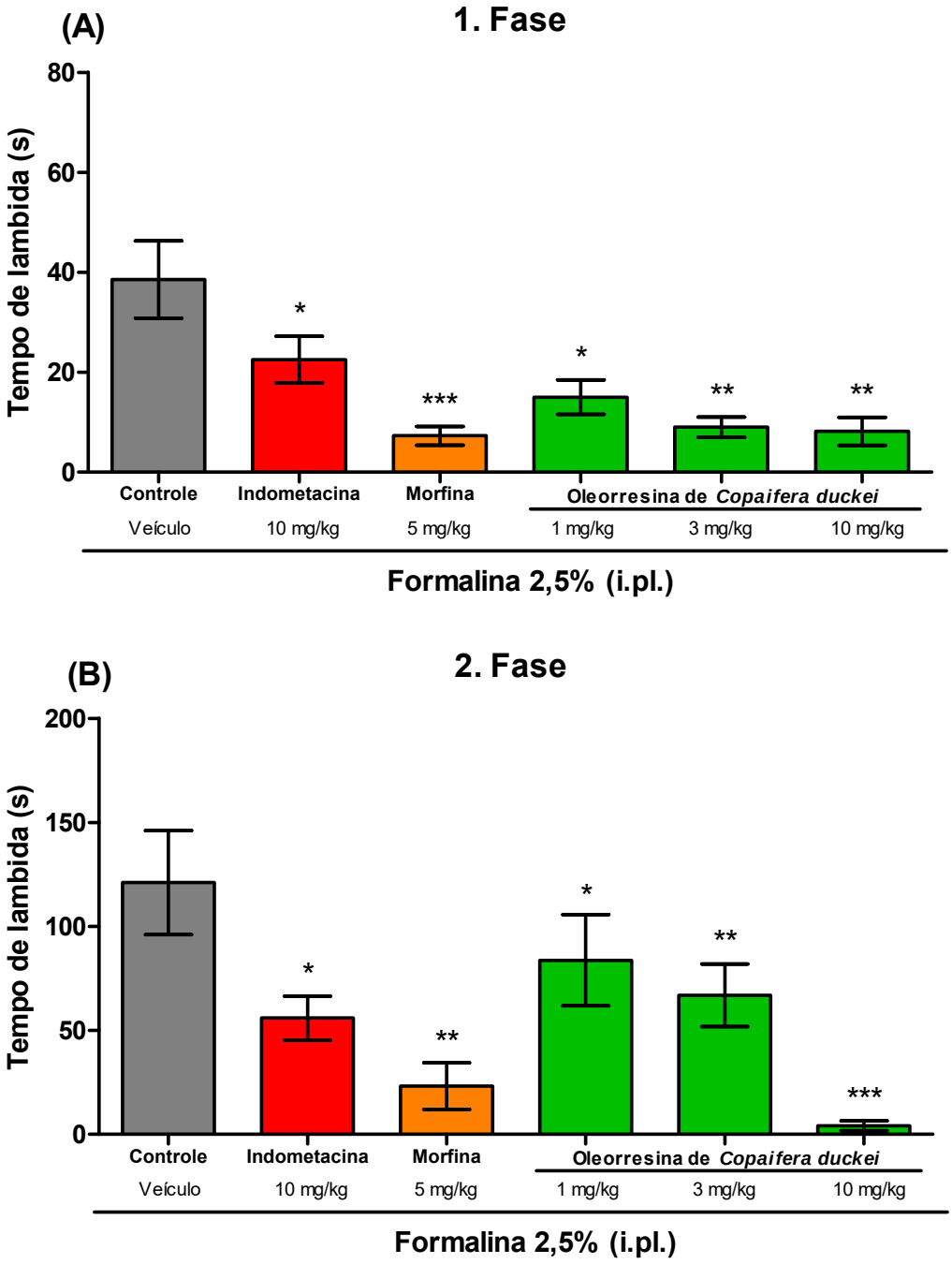


Figura 31. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o., e morfina, na dose de 1 mg/kg, i.p. sobre o tempo de lambida (s) induzidas por formalina 2,5%/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. (**A**) Primeira fase (0-5', neurogênica). (**B**) Segunda fase (15-30', inflamatória). Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

O ácido poliáltico reduziu a resposta também de forma dose-dependente na primeira fase do ensaio (**Figura 32**), sendo que as doses de 1, 3 e 10 mg/kg reduziram em 51±11%, 63±9% e 71±75% respectivamente. A indometacina (10 mg/kg) apresentou uma inibição máxima de 65±9% e a morfina (5 mg/kg) de 86±10%.

Na segunda fase do processo, estas doses apresentaram inibições de 54±12%, 60±13% e 96±2%, respectivamente. A indometacina inibiu de forma significativa com inibição máxima de 69±14%. A morfina por sua vez apresentou uma inibição de 81±7%.

A DI_{50} calculada na primeira fase para o tratamento com a oleorresina de *C. duckei* foi de 1,028 mg/kg ("0,277 – 3,806"; R^2: 0,734), e na segunda fase foi de 1,058 mg/kg ("0,468 - 2,390"; R^2: 0,854).

A dor é descrita como uma resposta complexa e indefinida, de difícil descrição e interpretação, que envolve múltiplos componentes, tanto fisiológicos (nociceptores), quanto cognitivos, afetivos e emocionais (NEUGEBAUER et al., 2009). Para tanto, não podemos inferir que animais estão expressando a dor, pois de acordo com essa definição, não conseguimos mensurar as respostas afetivas e emocionais, somente a resposta cognitiva e fisiológica, reportando como resposta nociceptiva. Ensaios que avaliem respostas nociceptivas necessitam de boa interpretação, de um pesquisador experiente para que não ocorram respostas falso-negativas ou falso-positivas e eliminar interferentes. Porém, o ensaio de lambida de pata ou ensaio da formalina é um teste simples e útil para avaliar o potencial de uma substância antinociceptiva ou anti-inflamatória, e também indica uma direção ao pesquisador para elucidar o possível mecanismo de ação (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; TJØLSEN et al., 1992).

Com relação à regulação da nocicepção, a primeira sinapse da via da dor ocorre no corno dorsal espinal, local chave para a regulação da transmissão da nocicepção. A sensibilização no corno espinal ocorre na primeira fase do ensaio de formalina, e é o maior fator na indução e na manutenção da nocicepção na segunda fase do ensaio da formalina. A sensibilização causada pela formalina resulta na liberação de mediadores tais como glutamato e substância P na fenda pré-sináptica dos terminais centrais e periféricos. O processo periférico da inflamação neurogênica ocorre por estímulo nos receptores de glutamato presentes nessas terminações (*N*-metil-*D*-aspartato ou NMDA, ácido-*α*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico ou AMPA, cainato e substância P) que agem sinergicamente para promover aumento da

excitabilidade neuronal e sensibilização central (EDELMAYER et al., 2009; HEINRICHER et al., 2009; HOUGH; RICE, 2011).

Entre a primeira fase e a segunda fase deste ensaio ocorre a intérfase. A inibição nesta fase ocorre fisiologicamente pelas fibras descendentes. Os estímulos nociceptivos ativam as vias descendentes analgésicas, e nos animais essa ativação foi observada através da ausência de resposta nociceptiva (HEINRICHER et al., 2009; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; MILLAN, 2002).

A fase inflamatória, a segunda fase, inicia-se 15 minutos após a injeção e é caracterizada pela sensibilização periférica modulada pela medula espinhal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; SAYYAH; HADIDI; KAMALINEJAD, 2004). As mudanças fisiológicas que acompanham a inflamação incluem a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios. Os mediadores responsáveis por essas alterações são a substância P, a bradicinina, o óxido nítrico, glutamato e outros peptídeos, além de prostaglandinas (ESFAHANI et al., 2012; GARCÍA et al., 2004; GUO et al., 2008).

De maneira complementar aos resultados observados no ensaio de contorções por ácido acético, os resultados observados neste ensaio demonstram que há inibição nas duas fases do teste de maneira similar. Isto nos leva a supor que a oleorresina de *C. duckei* e seu componente majoritário possuem efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, atuando na dor tanto de origem neurogência como inflamatória.

Na primeira fase do teste, onde ocorre uma estimulação direta da fibra nociceptiva, a administração da oleoresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico produziram resultados superiores ao controle indometacina na dose 10 mg/kg, ao passo que na dose de 10 mg/kg, a oleoresina e o ácido poliáltico apresentaram resultados superiores a morfina, a qual é reconhecidamente um dos mais eficientes analgésicos existentes.

Os eventos inflamatórios da segunda fase são diminuídos pela administração da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico, apresentando resultados superiores ao controle indometacina. Neste sentido, é importante ressaltar que a indometacina, pertencente à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), possui potente atividade anti-inflamatória através da inibição inespecífica das enzimas COX 1 e 2.

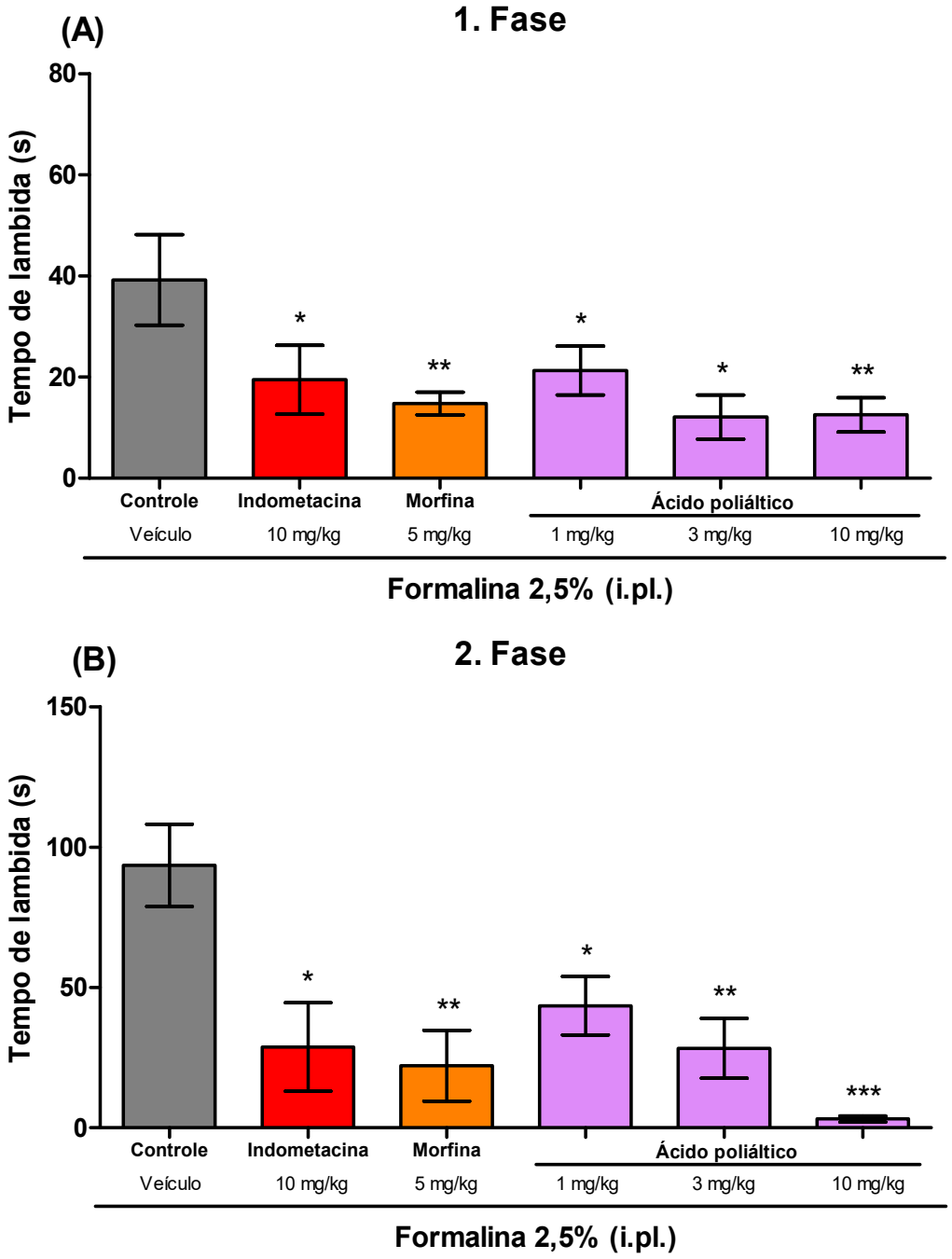


Figura 32. Gráfico do efeito da administração de ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o., e morfina, na dose de 1 mg/kg, i.p. sobre o tempo de lambida (s) induzidas por formalina 2,5%/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. (**A**) Primeira fase (0-5'). (**B**) Segunda fase (15-30' Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Gomes e colaboradores (2010, 2007) também demonstram que a atividade das oleorresinas de *C. multijuga* e *C. reticulata.* Porém, a inibição mais efetiva ocorreu na segunda fase do ensaio, demonstrando que as oleorresinas de *Copaifera* podem possuir atividades anti-inflamatórias.

Portanto, os resultados obtidos neste teste, nos permitem sugerir que a oleoresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico possuem ações sobre os nociceptores, direta ou indiretamente, modulando a transmissão periférica dos estímulos nociceptivos, uma vez que sua administração inibiu de forma eficiente a primeira fase do ensaio de formalina, onde ocorre uma estimulação direta das fibras nociceptivas. Os resultados obtidos na segunda fase do teste, no qual ocorrem eventos inflamatórios, sugerem ainda que há atividade anti-inflamatória, modulando também os processos nociceptivos dependentes de mediadores inflamatórios.

5.6.4 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre a nocicepção térmica através do teste de retirada da cauda (*Tail-Flick*)

O ensaio de retirada da cauda ou *Tail-flick* tem como objetivo avaliar a nocicepção térmica e o envolvimento central medular (ABBOTT; MELZACK; SAMUEL, 1982; HOLE; TJØLSEN, 1993). Para avaliar o tempo de reação ao calor foi utilizada uma fonte radiante de calor que emite somente um ponto a 55 °C. Variações do teste também permitem o aquecimento gradativo (D'AMOUR; SMITH, 1941).

A retirada da cauda acontece através de um movimento reflexo de origem espinhal, rápido e vigoroso em resposta ao estímulo térmico. Substâncias com atividades antinociceptivas que atuam por mecanismos semelhantes aos opioides aumentam o tempo de latência em resposta a este estímulo (OLIVEIRA; SOUSA; ALMEIDA, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; RAFFA et al., 1992). O aumento do tempo de resposta é considerado um parâmetro importante para a avaliação da atividade antinociceptiva, já que a resposta envolvida é o bloqueio da nocicepção aguda e não a diminuição do processo inflamatório, tais como os opioides, que não possuem atividade anti-inflamatória, mas atuam por suprimir a resposta de neurônios espinhais (FISCHER et al., 2008).

Os animais foram colocados no aparelho com a cauda sobre a fonte de calor e o tempo que os animais levaram para retirar a cauda após a aplicação do estímulo térmico foi cronometrado. O tratamento dos animais com a oleorresina de *C. duckei*

produziu um aumento do limiar nociceptivo de camundongos expostos à fonte de calor (**Figura 33, A**), quando comparados ao controle, com inibições máximas calculadas de 41±9%, 56±11% e 68±%, respectivamente para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg. A morfina mostrou-se um analgésico mais eficaz e potente, aumentando também o limiar nociceptivo dos animais com inibição máxima de 98±6%. A DI_{50} calculada foi de 11,68 mg/kg ("0,489 – 27,789"; R^2: 0,806).

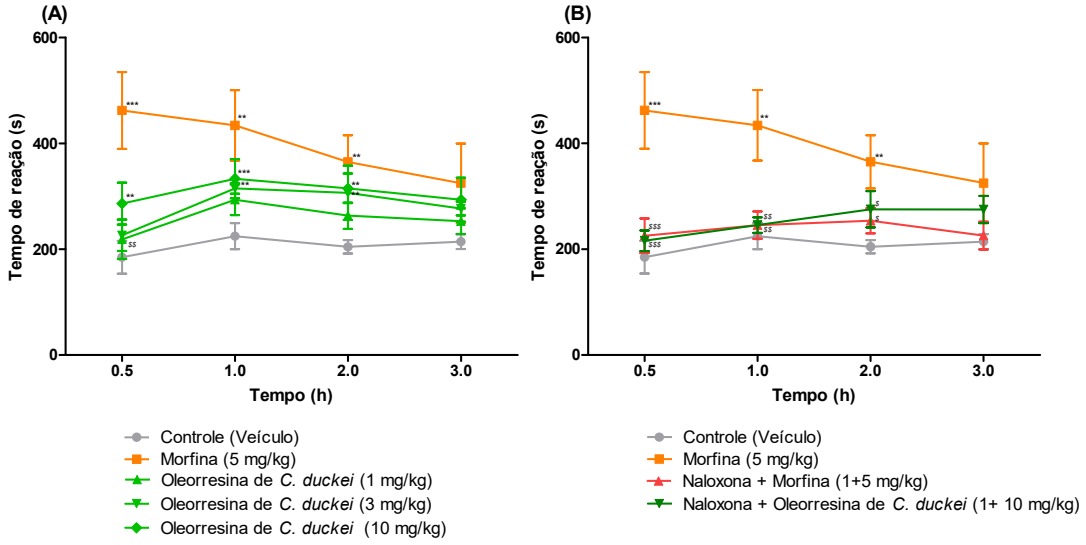


Figura 33. (**A**) Gráfico do efeito da administração de oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo morfina ($^{\$\$}$p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. (**B**) Gráfico do efeito da administração de naloxona + oleorresina de *C. duckei*, na dose de 1+10 mg/kg, i.p. e v.o. e naloxona + morfina, na dose de 1+ 5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001) e ao grupo morfina ($^{\$}$p<0,05, $^{\$\$}$p<0,01 e $^{\$\$\$}$p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

O ácido poliáltico aumentou o limiar nociceptivo de camundongos expostos à fonte de calor (**Figura 34, A**), quando comparados ao controle, com inibições máximas calculadas de 58±8% e 66±12% e 74±6% respectivamente para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg. A morfina mostrou-se um analgésico mais eficaz e potente, aumentando também o limiar nociceptivo dos animais com inibição máxima de 93±3%. A DI_{50} calculada foi de 18.73 mg/kg ("3.463 - 43.352"; R^2: 0,723).

Foi evidenciado, através da administração da naloxona, que a atividade antinociceptiva da morfina é mediada pela ativação de receptores opioides

(GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008). Porém, a coadministração de naloxona com a oleorresina de *C. duckei* (**Figura 33, B**), ou a coadministração de naloxona com o ácido poliáltico (**Figura 34, B**) não alteram o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico. Assim, podemos sugerir que a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico não possuem efeitos antinociceptivos sobre o sistema nervoso central, já que seu efeito não foi alterado com a administração de um antagonista de receptor de opioide, a naloxona (GRUBB, 1998; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Anti-inflamatórios não esteroidais, tais como diclofenaco, ibuprofeno e indometacina não tem seus efeitos farmacológicos alterados pelos antagonistas de receptor opioide, uma vez que seus mecanismos antinociceptivos interferem em outras vias como, por exemplo, a inibição da enzima COX. Analgésicos não opioides como a dipirona e o paracetamol também exercem modulação periférica do sinal nociceptivo, porém são inefetivos no teste de retirada de cauda (GELGOR; CARTMELL; MITCHELL, 1992).

Em hipótese, os resultados obtidos no ensaio de retirada de cauda demonstram que a resposta antinociceptiva apresentada pela oleorresina de *C. duckei* e pelo ácido poliáltico ocorre devido à redução dos mediadores inflamatórios responsáveis pela sensibilização dos nociceptores. Porém, como este é um ensaio que avalia a atividade antinociceptiva central (RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003) e não a atividade antinociceptiva relacionada aos mecanismos inflamatórios, não podemos descartar que a oleorresina e o ácido poliáltico possam atuar sobre a modulação da transmissão do sinal nociceptivo, seja a nível periférico ou central (FISCHER et al., 2008).

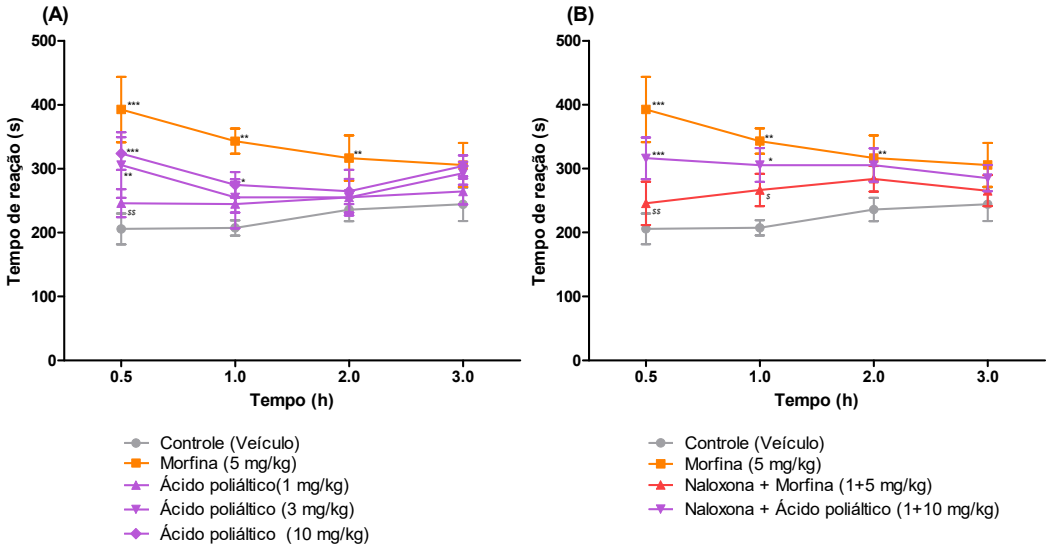


Figura 34. (**A**) Gráfico do efeito da administração de ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo morfina ($^{\$\$}$p<0,01), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni. (**B**) Gráfico do efeito da administração de naloxona + ácido poliáltico, na dose de 1+10 mg/kg, i.p. e v.o. e naloxona + morfina, na dose de 1+5 mg/kg, i.p., sobre o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico (55 °C) no teste de *tail flick* em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001) e ao grupo morfina ($^{\$\$}$p<0,01 e $^{\$\$\$}$p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

5.6.5 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia mecânica

A avaliação do aumento da sensibilidade de nociceptores a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia) são realizados através de modelos de hiperalgesia mecânica, em especial o teste de von Frey. Os receptores presentes na fibra Aδ e na fibra C podem ser ativados por mecanorreceptores, quase sempre resultando em estímulos inespecíficos, que muitas vezes não resultam em resposta nociceptiva (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Nos modelos de hipernocicepção mecânica os animais recebem uma injeção intraplantar de um agente flogístico, que pode ser formalina, carragenina, LPS, CFA, PGE_2, entre outros, e são submetidos à avaliação com um monofilamento de von Frey de 0,6 g, que consiste de um filamento de nylon de 0,6 mm de diâmetro. Este pequeno instrumento exerce uma pressão padronizada no centro da pata do animal, até que o animal produza uma resposta caracterizada por uma vigorosa sacudida, o

comportamento chamado de "*flinch*" na pata que recebe o estímulo. Os estímulos são repetidos dez vezes com o objetivo de se obter a frequência de resposta em porcentagem de cada animal (QUINTÃO et al., 2005, 2006; VIVANCOS et al., 2004).

Os ensaios de investigação de hiperalgesia mecânica realizados com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico demonstram que tais produtos naturais derivados da copaíba possuem potencial para estudos mais aprofundados em diferentes modelos de hiperalgesia, como por exemplo, modelos de hiperalgesia de origem inflamatória e neuropática, ou ainda, verificar uma possível influência anti-inflamatória no efeito anti-hiperalgésico observado primeiramente.

Inicialmente, foram avaliados os efeitos a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico frente à resposta hiperalgésica induzida pela formalina. O ensaio de formalina diferencia-se dos demais testes de dor por permitir verificar a resposta do animal a uma dor contínua e moderada gerada por tecido lesionado. Este fato permite que este ensaio se apresente como o mais aproximado da dor clínica, quando comparado aos ensaios de nocicepção aguda, tais como o estímulo térmico (ABBOTT; MELZACK; SAMUEL, 1982; DUBUISSON; DENNIS, 1977).

A administração de formalina, nos primeiros 30 minutos produz como resposta um comportamento estereotipado (TAYLOR; PETERSON; BASBAUM, 1995), caracterizado por duas fases distintas, a fase neurogênica e a fase inflamatória. Após este período, embora o animal não apresente o mesmo comportamento estereotipado, o processo inflamatório persiste, resultando em uma resposta hipernociceptiva do tipo inflamatória (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995; DUBUISSON; DENNIS, 1977; TJØLSEN et al., 1992).

Esta resposta inflamatória após a segunda fase do teste de formalina está associada à liberação de mediadores endógenos locais, que geram resposta inflamatória local, responsável pela sensibilização de aferentes primários e de neurônios medulares subsequente a ativação de nociceptores (CALCUTT et al., 1994; SHIBATA et al., 1989; YANG et al., 2012).

Observando-se a **Figura 35**, a oleoresina de *C. duckei* quando administrada v.o. 30 minutos antes da injeção i.pl. de formalina nas três doses testadas (1, 3 e 10 mg/kg), reduziu a hiperalgesia mecânica quando comparado com o grupo controle. Essas doses apresentaram inibições máximas com percentuais de 34±15%, 53±12% e 72±12%. As inibições da indometacina e da morfina foram de 56±13% e 74±9%,

respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 2,522 mg/kg ("1,250 – 5,091"; R^2: 0,735).

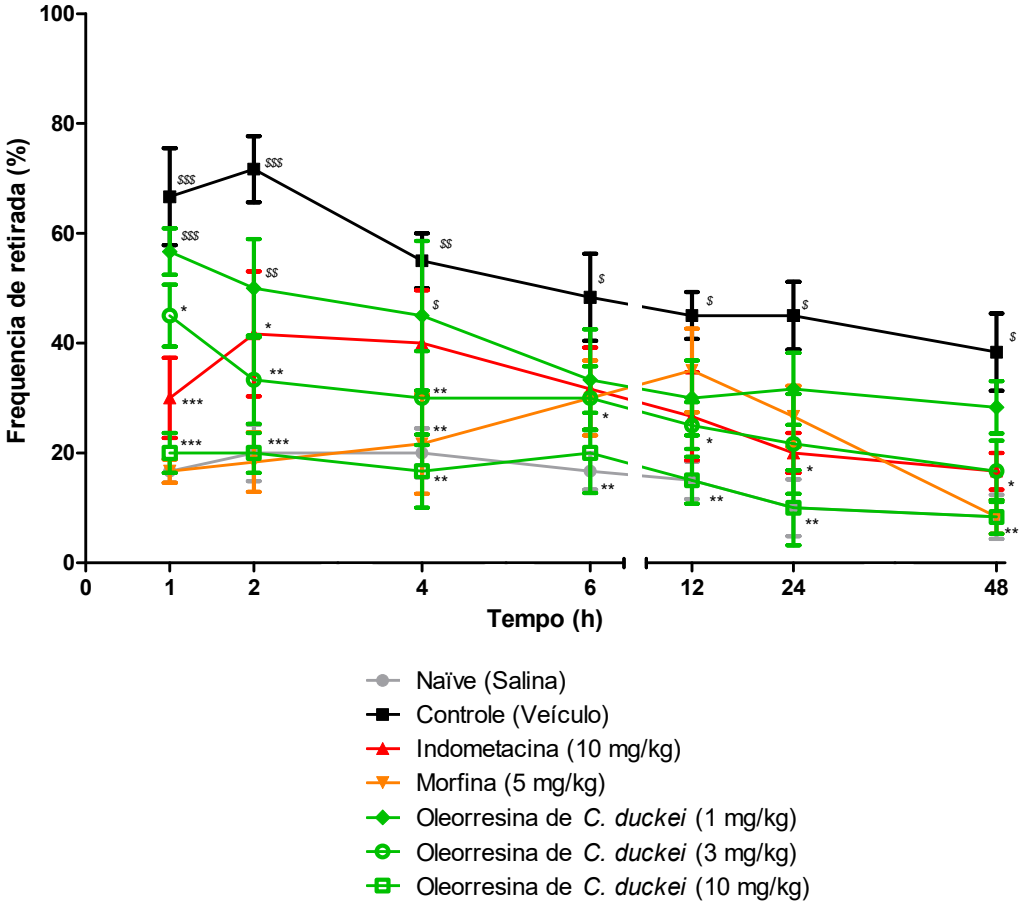


Figura 35. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de formalina 2,5% (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

É importante destacar que a oleoresina de *C. duckei* apresentou resultados similares ao controle indometacina na dose de 10 mg/kg. Esta mesma dose, também apresentou valor de inibição próximo aquele encontrado para morfina, levando a sugerir que a oleoresina possua ações anti-hiperalgésicas. Em dados da literatura, a oleoresina de *C. multijuga* Hayne também foi submetida à avaliação anti-hiperalgésica em estudo realizado por Gomes e colaboradores (2010). No entanto, tal oleorresina não apresentou significativa atividade neste ensaio.

De maneira similar, o ácido poliáltico também foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica quando comparado com o grupo controle. Na **Figura 36** podemos observar o efeito do ácido poliáltico quando administrado v.o. 30 minutos antes da injeção i.pl. de formalina. As doses de 1, 3 e 10 mg/kg apresentaram inibições máximas com percentuais de 31±12%, 54±13% e 76±19%, respectivamente. As inibições da indometacina e da morfina foram de 50±18% e 71±13%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 2,928 mg/kg ("1,060 – 8,085"; R^2: 0,919).

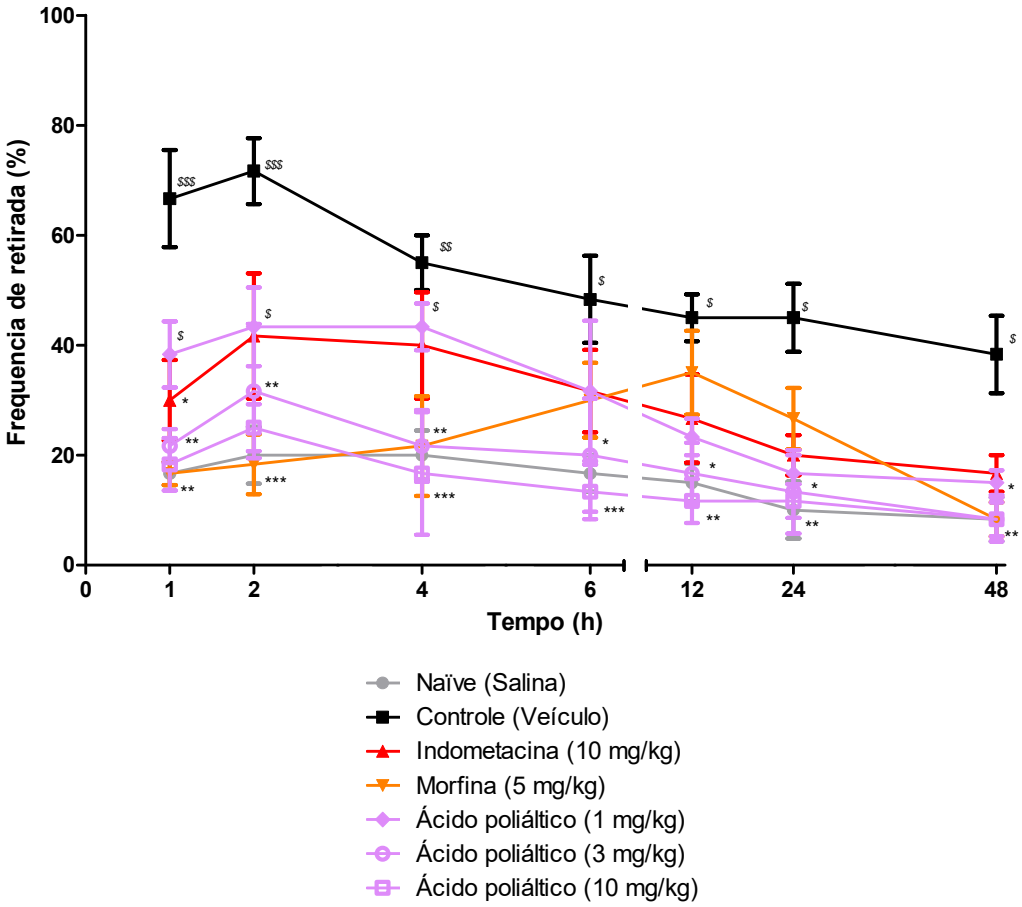


Figura 36. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de formalina 2,5% (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($^{\$}p$<0,05, $^{\$\$}p$<0,01 e $^{\$\$\$}p$<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

Estes resultados sugerem que a atividade anti-hiperalgésica observada nos animais tratados possa estar relacionada com as vias de propagação da transmissão

nociceptiva a nível periférico, que podem estar diminuídas devido à diminuição de mediadores inflamatórios. Pode-se sugerir, portanto, que a oleoresina de *C. duckei* bloqueia ou reduz a transmissão do sinal nociceptivo, impedindo que este seja transmitido para os centros integrados do sistema nervoso central e ainda é importante levar em consideração que a formalina além de estimular as fibras A*δ* e nociceptores de fibras C, também promove a liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, substância P e serotonina, os quais também promovem a sensibilização dos nociceptores, podendo desta forma participar de eventos de hipernocicepção. Sendo assim, também é possível que a oleoresina possa agir reduzindo os processos de sinalização da dor inflamatória, interferindo desta forma na ação dos mediadores inflamatórios (GOMES et al., 2007; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; SHIBATA et al., 1989).

No ensaio de hiperalgesia induzida por carragenina a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico foram avaliados frente à resposta hiperalgésica de origem inflamatória. A carragenina é extraída de extratos de algas marinhas vermelhas (rodófitas), as carraginófitas, comuns nas costas de áreas oceânicas temperadas que. Quando injetada intradermicamente, essa substância estimula o desencadeamento dos fenômenos de transformações nos tecidos, sendo amplamente utilizada como ferramenta farmacológica no estudo de processos hiperalgésicos e inflamatórios em camundongos e ratos (GARCIA LEME et al., 1973). É um agente pró-inflamatório muito conhecido e utilizado em estudos envolvendo a hiperalgesia inflamatória em ratos e camundongos.

A aplicação da carragenina resulta em uma resposta inflamatória clássica, os sinais cardinais, caracterizada pela formação de rubor, calor (aumento da temperatura na região inflamada), tumor (edema), dor e alguns casos, perda da função. A hiperalgesia induzida por carragenina permite quantificar a ação de grupos de analgésicos periféricos com diferentes mecanismos de ação, principalmente os mecanismos inflamatórios (CHOU, 2003; MCDOUGALL, 2006; ORLANDI et al., 2011; SALVEMINI et al., 1996).

Esta resposta inflamatória induz aumento ao infiltrado de neutrófilos, aumento nos níveis de metabólitos do ácido araquidônico (PGE_2), produtos originados de mastócitos (5-HT), histamina, neuropeptídeos (substância P, bradicinina) (MELZACK; WALL, 1965), bem como promove a liberação de TNF-α. Estes agem por dois caminhos distintos: indução da COX-2 e subsequente síntese de eicosanoides por IL-

1; e indução da produção de aminas simpaticomiméticas por IL-8 (CUNHA et al., 2005; LIAO et al., 2013; LIMA et al., 2005; POSADAS et al., 2004), óxido nítrico (OMOTE et al., 2001), fatores de transcrição (NF-κB, IRFs, CREB1), dentre outros (CUNHA et al., 2005). Por fim, ocorre o desenvolvimento exacerbado de sensibilidade de neurônios primários sensoriais nociceptivos a um estímulo doloroso térmico ou mecânico (GARCIA LEME et al., 1973; OMOTE et al., 2001; VIVANCOS et al., 2004; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o pré-tratamento oral com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico produziram efeito anti-hiperalgésico significativo no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de carragenina, destacando que esses efeitos foram duradouros, observados por até 24 h após a indução com a carragenina.

Observando-se a **Figura 37**, a oleoresina de *C. duckei* quando administrada v.o. 30 minutos antes da injeção i.pl. de carragenina nas três doses testadas (1, 3 e 10 mg/kg), foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica quando comparada com o grupo controle. Essas doses apresentaram inibições máximas com percentuais de 38±11%, 56±16% e 55±12%. As inibições da indometacina e da morfina foram de 55±14% e 66±19%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 5,712 mg/kg ("1,592 – 20,50"; R^2: 0,817).

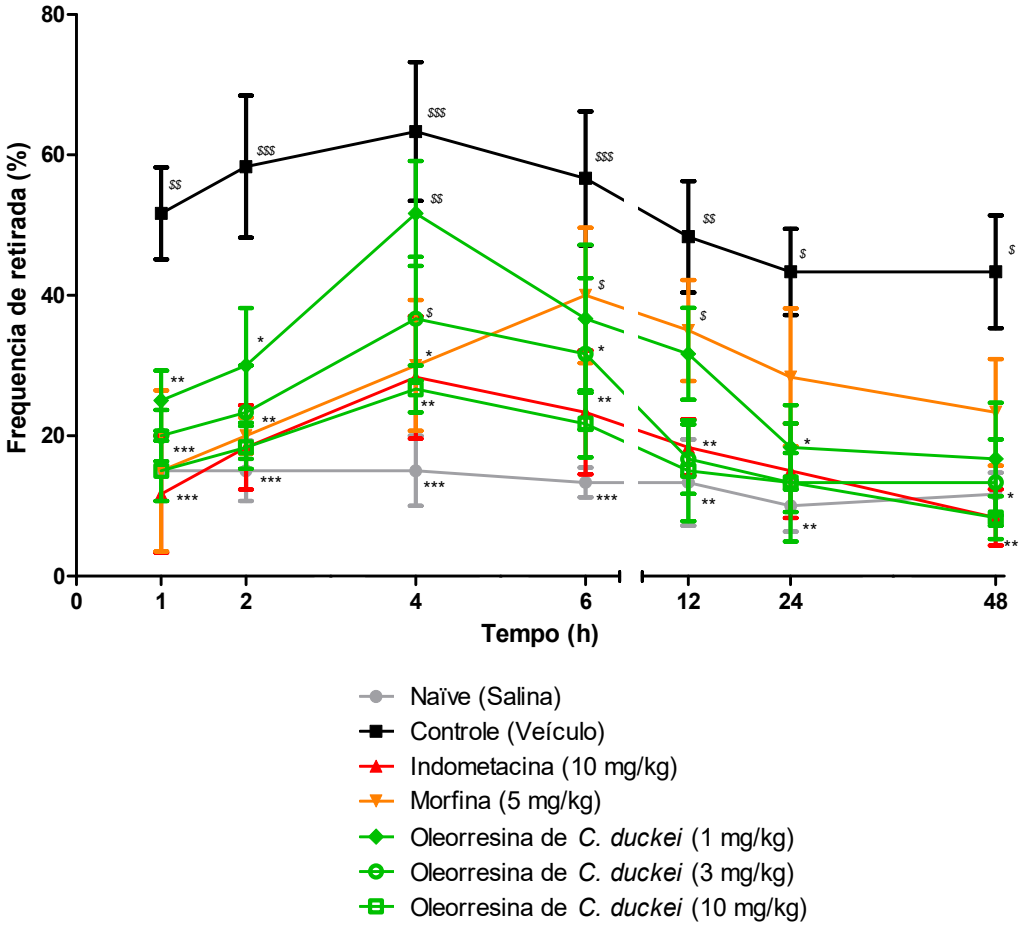


Figura 37. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada *linha* representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (**p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001), e ao grupo naïve ($^{\$}p$<0,05, $^{\$\$}p$<0,01 e $^{\$\$\$}p$<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Já o ácido poliáltico resultou em uma diminuição significativa da sensibilização mecânica, e possivelmente pode ser o responsável pela atividade anti-hiperalgésica observada na oleorresina de *C. duckei.* Na **Figura 38** podemos observar o efeito do ácido poliáltico quando administrado v.o. 30 minutos antes da injeção *i.pl.* de carragenina. As doses de 1, 3 e 10 mg/kg apresentaram inibições máximas com percentuais de 38±13%, 51±11% e 69±14%, respectivamente. As inibições da indometacina e da morfina foram de 54±13% e 65±10%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 4,858 mg/kg ("0,5545 – 42,55"; R^2: 0,806).

A atividade do ácido poliáltico pode estar relacionada com as vias de sinalização da dor inflamatória, interferindo na sensibilização periférica de neurônios sensoriais, liberação de citocinas, síntese e/ou expressão de enzimas e produção de prostanoides, o que reforça a hipótese de que as oleorresinas de *Copaifera* sp. modulam a transmissão nociceptiva e também atuam por vias anti-inflamatórias.

Estudos realizados por Veiga-Júnior e colaboradores (2007) demonstraram que a oleoresina de *Copaifera cearensis* provoca redução significativa no total de leucócitos e acúmulo de neutrófilos, os quais participam ativamente de diversos processos inflamatórios, modulando a ação das células e dos mediadores.

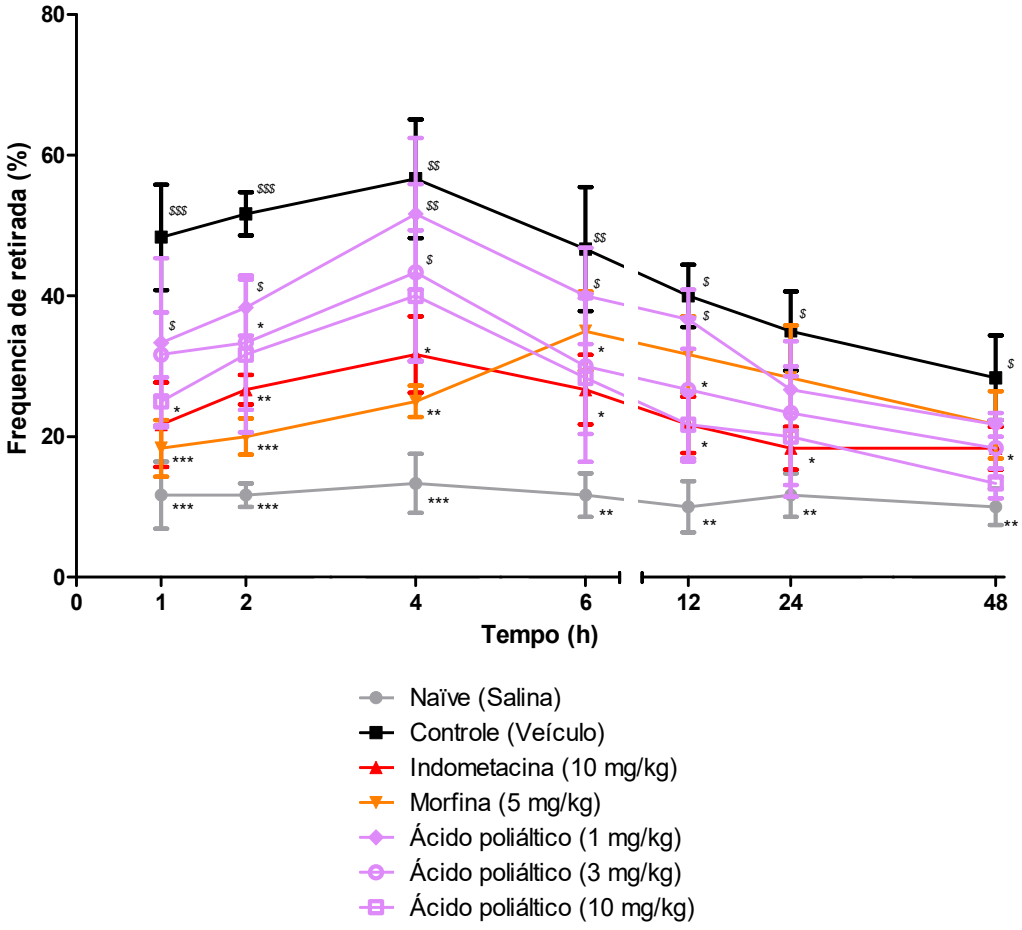


Figura 38. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, *v.o.* morfina, na dose de 5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada *linha* representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

A dextrana é um polissacarídeo de alto peso molecular, constituído de unidades de glicose unidas por ligações glicosídeas α-1,4 e α-1,6, isoladas de bactérias *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp e comercializado sob a forma de sal (sulfato de sódio dextrana, ou *dextran sulfate sodium* - DSS) (FURTADO et al., 2015; PARRATT; WEST, 1958; VAN WAUWE; GOOSSENS, 1989).

A dextrana induz reações anafiláticas, caracterizada pelo extravasamento de fluido, resultando na formação de edema, em resposta à liberação de histamina e serotonina pela desgranulação de mastócitos (BASTOS et al., 2001; PARRATT; WEST, 1958; VAN WAUWE; GOOSSENS, 1989). Dessa forma é possível associar a atividade antiedematogênica da substância com a interferência na síntese/liberação ou bloqueio das ações da histamina e/ou 5-HT. A dextrana é amplamente utilizada em modelos de indução de colite, sendo bastante relacionado à colite ulcerativa encontrada em humanos, pois permite a instalação de um processo inflamatório intestinal limitado à mucosa cólica (WIRTZ et al., 2007).

O processo inflamatório induzido pela dextrana ativa células da imunidade inata, tais como macrófagos e neutrófilos (BAILÓN et al., 2008; XU et al., 2012). Atualmente, sabe-se que os neutrófilos possuem um papel importante na indução de respostas hipernoceptivas inflamatórias. Cunha e colaboradores (2008) relatam que a migração de neutrófilos está diretamente associada com a cascata de eventos que leva a indução da nocicepção mecânica através da produção de mediadores, tais como a PGE_2. A dextrana induz um aumento da migração de células inflamatórias, neutrófilos e também polimorfonucleares, e em resposta aos mediadores liberados por estas células, ocorre alteração do limiar noceptivo, gerando respostas dolorosas mais intensas quando estimulados (COLEMAN, 2001; IALENTI et al., 1992; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; OH; LEE; LIM, 2007).

Além das citocinas e quimiocinas, as enzimas, COX-2, 5-LOX e NOSi, também são induzidas diante de um processo inflamatório, as quais exercem papel importante na modulação da inflamação (IALENTI et al., 1992; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; OH; LEE; LIM, 2007; VAN WAUWE; GOOSSENS, 1989). Todos estes eventos resultam na manutenção tanto do processo inflamatório, quanto da resposta nociceptiva.

Os animais que receberam injeção intraplantar de dextrana na pata direita traseira tiveram indução da dor associada à inflamação, verificada pelo aumento no limiar nociceptivo nas patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de

tempo. O grupo de animais pré-tratados com veículo apresentou uma frequência de resposta significativamente maior que os demais grupos tratados com a oleorresina de *C. duckei* (**Figura 39)** ou o ácido poliáltico (**Figura 40)**, além dos controles positivos indometacina e dexametasona.

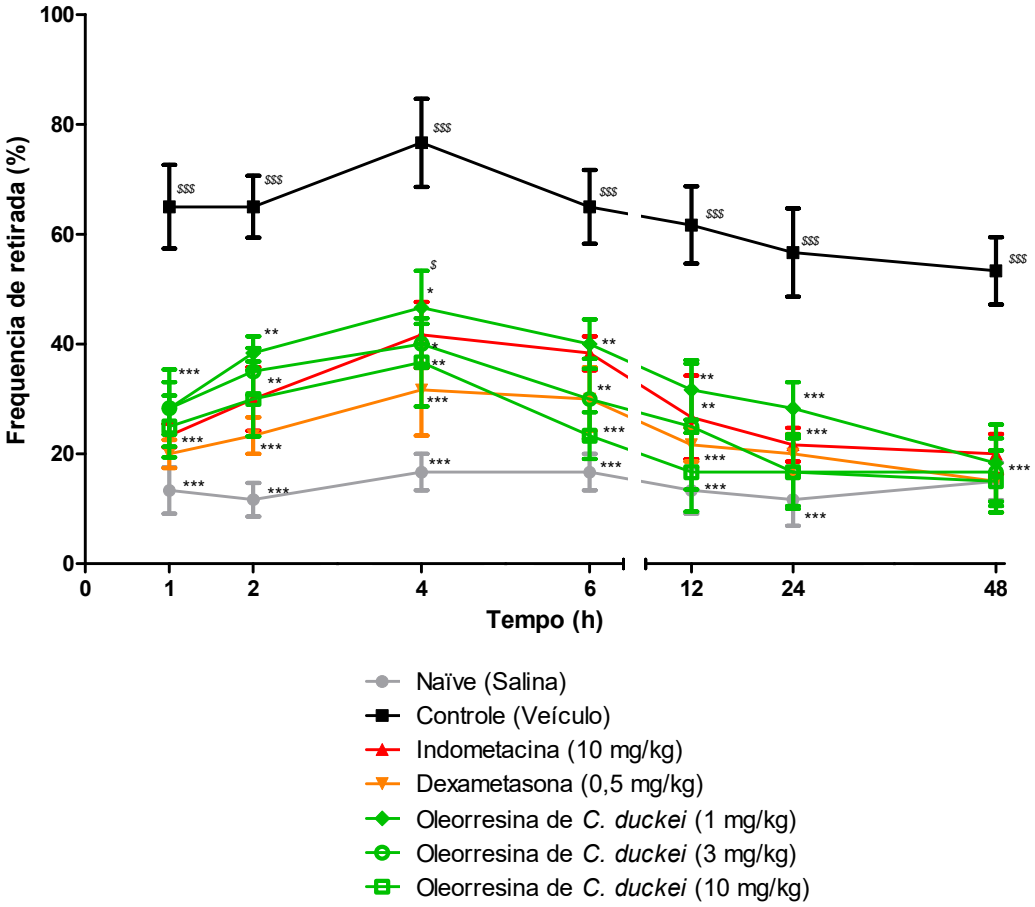


Figura 39. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Na hiperalgesia induzida por dextrana as inibições máximas foram com percentuais de 39±12%, 50±10% e 52±6% para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg de oleorresina de *C. duckei,* respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 5,362 mg/kg ("0.005439 – 54.90"; R^2: 0,876).

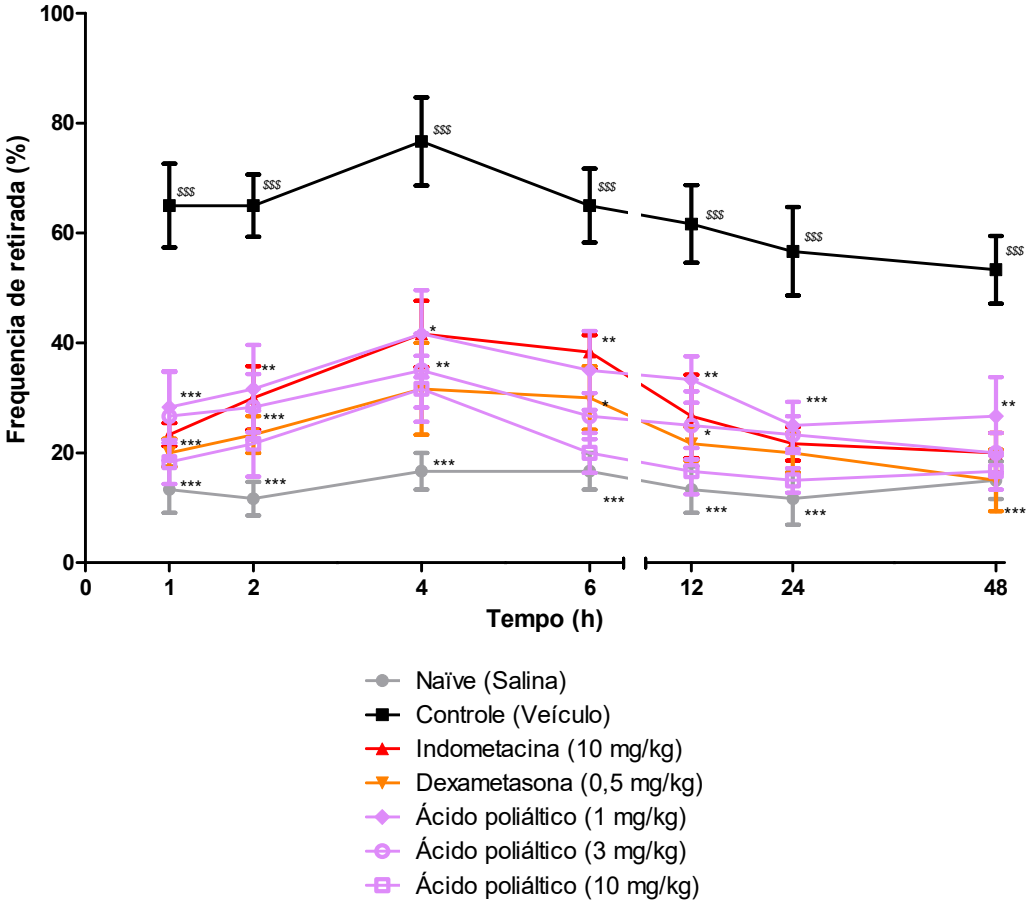


Figura 40. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

As doses de 1, 3 e 10 mg/kg de ácido poliáltico apresentaram inibições máximas com percentuais de 46±4%, 57±4% e 59±3%, respectivamente. As inibições da indometacina e da dexametasona foram de 46±9%e 59±7% respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 4,135 mg/kg ("0.002137 – 45.64"; R^2: 0,864).

Os dados obtidos para as substâncias presentes nos tratamentos experimentais possibilitam fazer ao menos uma associação entre composição química e efeitos observados. Compostos terpênicos, tais como o β-cariofileno demonstram atividades antinociceptivas por atuar em adrenoceptores. Tais receptores podem estar atuando em uma das vias antiedematogênicas, pois o pré-tratamento de animais com

catecolaminas diminui a inflamação induzida por dextrana. Catecolaminas podem atuar diretamente sobre mastócitos, através de receptores α e β, resultando na diminuição de fatores vasoativos, tais como histamina e serotonina (AKDIS; BLASER, 2003; AKDIS; SIMONS, 2006; BAXTER; BEAVEN; HORÁKOVÁ, 1974).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas. É liberada quando a bactéria é multiplicada ou fagocitada, sendo degradada pelas células de defesa (KNAPP et al., 2003; TUIN et al., 2006). Estruturalmente é composta de duas camadas de polissacarídeos e uma camada lipídica, apresentando porções hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo a porção lipídica a responsável pela ação antigênica (RAETZ; WHITFIELD, 2002)

É considerado o principal responsável pelas manifestações tóxicas e inflamações sistêmicas de infeções causadas por bactérias Gram-negativas (DAVIES, M. G.; HAGEN, 1997; GREEN; DAFOE; RAJFIN, 1996; SÁEZ-LLORENS; MCCRACKEN, 1993)

A produção de citocinas em resposta ao LPS, é inicialmente e principalmente, comandada pelos macrófagos residentes (SAYERS et al., 1987), sendo tais citocinas de caráter pró-inflamatório, tais como TNF-α, IL-1β, IL-6, prostaglandinas e principalmente NO proveniente da enzima NOSi (BONATERRA et al., 2010; KASSIM et al., 2010; VAJJA et al., 2004).

Sabe-se que a oleorresina de *C. duckei* não apresenta grande potencial antioxidante *in vitro*, que foi confirmado pelos testes de DPPH, xantina oxidase e peroxidação lipídica em gema de ovo, descritos para a atividade gastroprotetora. Porém, houve perda da atividade gastroprotetora com a administração de L-NAME e NEM, bloqueador de NOSi e grupamentos sulfidrila, respectivamente, sendo que os níveis de nitrito estão ligeiramente diminuídos na mucosa gástrica, sugerindo a participação do sistema oxinitrérgico na promoção de eventos antioxidantes *in vivo.*

Na hipernocicepção induzida por LPS ocorre aumento da síntese de NO pela NOSi, e estes resultados demonstram que a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico podem estar antagonizando os efeitos de NO, inibindo ou reduzindo sua síntese (WALLACE; MA, 2001; WALLACE; MILLER, 2000)

A sensibilização das fibras nociceptivas ocorre em resposta a liberação de NO que ativa diretamente fibras sensoriais cerebrais, liberando o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e aumentando as concentrações de GMPc e AMPc, que

atuam como segundo mensageiros, promovendo a fosforilação, aumento de fluxo de Na^+ e Ca^{2+} e diminuindo K^+ (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; WOOLF; SALTER, 2000).

A sinalização intracelular desencadeada pelo LPS ocorre através da ligação com receptores próprios, sendo o Toll-like 4 (TLR4) o principal. Atualmente, vários são os pesquisadores que estudam o envolvimento dos receptores do tipo Toll (TRL) na sinalização e indução de genes pró-inflamatórios causados pelo LPS (BYRD-LEIFER et al., 2001; KAWASAKI et al., 2000; LU; YEH; OHASHI, 2008; TAKEDA; AKIRA, 2004). Estes receptores estão sendo identificados como sensores primários em infecções microbianas, permitindo a compreensão de vários mecanismos envolvidos nas respostas de imunidade inata e adquirida (LU; YEH; OHASHI, 2008; POLTORAK, 1998).

O reconhecimento do LPS ainda é mediado por moléculas LBP (proteínas ligante de LPS, *Lipopolysaccharide Binding Protein*), proteína CD14 e proteína MD-2 (proteína mieloide diferenciadora 2). Estas proteínas na forma solúvel atuam como proteínas auxiliares, transferindo o LPS para o receptor TLR4 (SHIMAZU et al., 1999; TAKEDA; AKIRA, 2004).

A ativação do TRL4 desencadeia diversas vias de sinalização, tais como MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein* 1), STAT (*signal tranducer and activator of transcription*), IRF3 (*interferon -regulatory factor 3*), sendo a ativação do fator de transcrição NF-κB (Nuclear factor kappa B) a principal via. Ao se translocar para o núcleo, o NF-κB promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (RAETZ; WHITFIELD, 2002; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015; TAKEUCHI; AKIRA, 2001).

A administração de LPS (100 ng/mL) na pata de ratos promove a sensibilização dos animais e, consequentemente, a hipernocicepção sob estímulo mecânico, originando esta resposta desde a primeira hora após a administração do LPS e atingindo um platô a partir da quarta hora.

A administração da oleorresina de *C. duckei* (**Figura 41)** e do ácido poliáltico (**Figura 42**) foram capazes de inibir o efeito hipernociceptivo do LPS, alterando o limiar de sensibilidade mecânica dos camundongos quando comparado aos valores basais, assim como nos controles indometacina e dexametasona.

As doses de 1, 3 e 10 mg/kg para a oleorresina de *C. duckei* apresentaram inibições máximas com percentuais de 43±12%, 50±8% e 57±7%, respectivamente.

As inibições da indometacina e da dexametasona foram de 38±4% e 62±6%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 9,120 mg/kg ("0.005257 – 82.759"; R^2: 0,724).

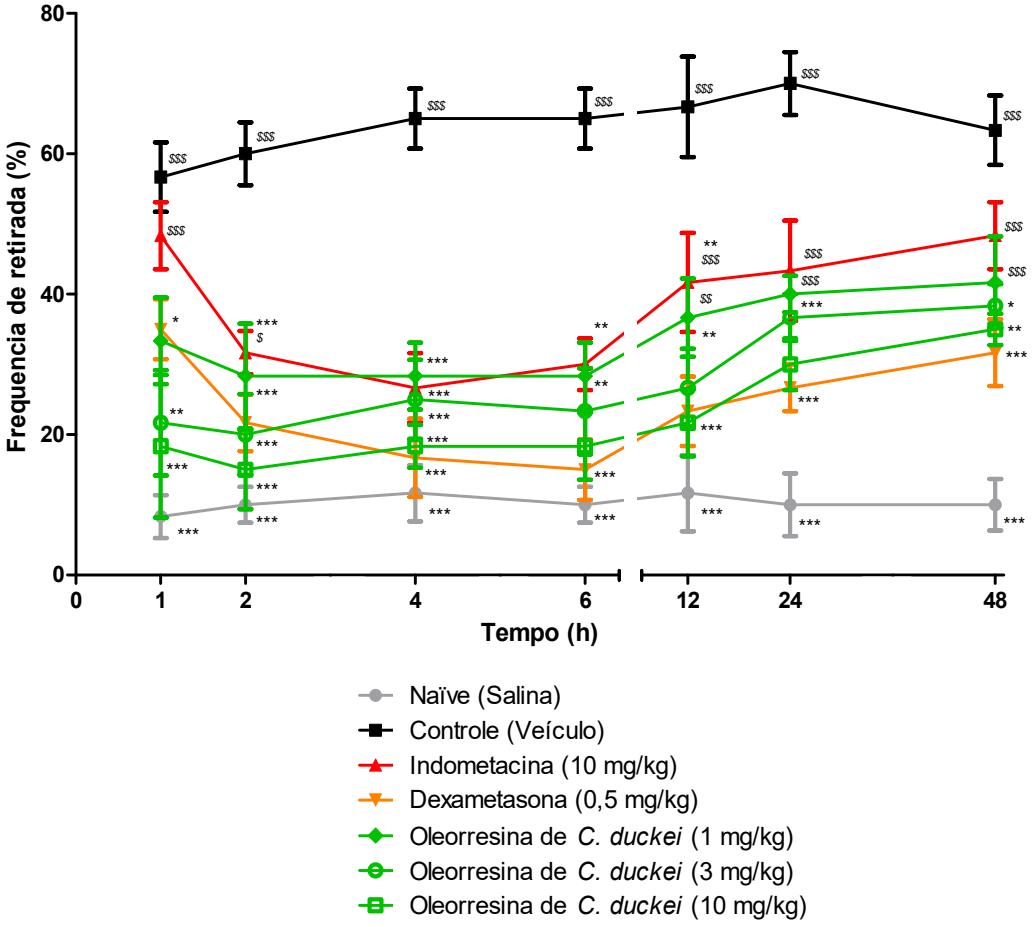


Figura 41. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

As doses de 1, 3 e 10 mg/kg de ácido poliáltico apresentaram inibições máximas com percentuais de 34±10%, 46±16% e 65±14%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 6,429 mg/kg ("1.676 – 3.522"; R^2: 0,766).

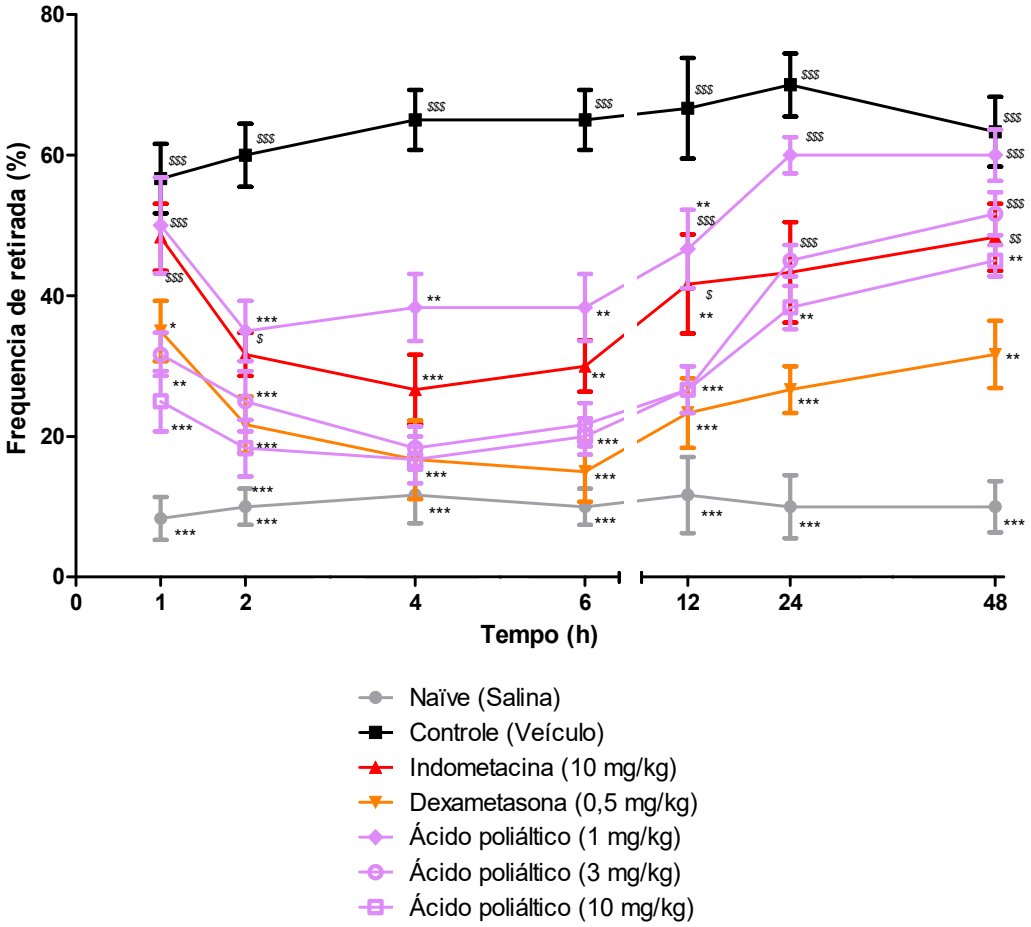


Figura 42. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Estes resultados sugerem que os compostos presentes na oleorresina de *C. duckei*, bem como seu composto majoritário, o ácido polialtico possam estar interferindo na produção de TNF-α, decorrente do estímulo do LPS (SAMPAIO et al., 1991).

O efeito anti-hipernociceptivo observado pode ser decorrente da diminuição da migração leucocitária para a área inflamada, inibindo a cascata de citocinas (CUNHA et al., 2005, 2008; PINHO-RIBEIRO et al., 2016; VAJJA et al., 2004).

O zymosan é um polissacarídeo composto de unidades de glicose unidas por ligações *p*-1,3-glicosídicas, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces*

cerevisiae. Induz fenômenos flogísticos sistêmicos, ativando macrófagos e induzindo a liberação de mediadores inflamatórios caracterizados pela persistente proliferação da sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo uma resposta inflamatória do tipo artrite inflamatória (GADÓ; GIGLER, 1991; GEGOUT et al., 1995; KEYSTONE et al., 1977; ROCHA et al., 1999).

A inflamação articular induzida por zimosan é caracterizada por acentuada migração celular e desenvolvimento de hiperalgesia. Ocorrem alterações da marcha dos animais devido a incapacitação articular progressiva, observável a partir da segunda hora após sua administração

Ocorrem ainda todos os sinais cardinais da inflamação aguda, tais como aumento da permeabilidade vascular e edema, com acentuado influxo celular, com predomínio de polimorfonucleares (FRASNELLI et al., 2005; ROCHA et al., 1999).

O zymosan é reconhecido a partir do receptor de selectina-1, expressos predominantemente em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dentríticas, e em menor proporção em células T do baço (WILLMENT et al., 2003). Após reconhecimento, interage com o receptor Toll-like 2 (TLR2), com consequente ativação do fator NF-κB, produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18) e outros fatores pró-inflamatórios (AKIRA; SATO, 2003; TAKEDA; AKIRA, 2004; TEXEREAU et al., 2005). Este receptor tem importante papel na fase tardia, no desenvolvimento da resposta imune secundária e pode contribuir com a manutenção da inflamação articular (FRASNELLI et al., 2005; KEYSTONE et al., 1977). Ativa também a resposta imune inata, sendo capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias e ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas (FRASNELLI et al., 2005).

Na fase crônica é acompanhada de intensa reação inflamatória, caracterizada por sinovite, com migração de células inflamatórias e proliferação linfomonocitária, além da degradação da cartilagem e do osso subcondral. A artrite também é caracterizada com respostas hipernociceptivas persistentes (GEGOUT et al., 1995; ROCHA et al., 1999).

Neste experimento, os resultados demonstram que a administração da oleorresina de *C. duckei* (**Figura 43**) e do ácido poliáltico (**Figura 44**) foi capaz de inibir o efeito hipernociceptivo do zymosan, indicando que possuem atividades a longo prazo, pois podem atuar inibindo respostas nociceptivas e inflamatórias tardias. Por este motivo foram investigadas as atividades anti-hipernociceptivas em modelos de

dor crônica, tais como a hiperalgesia mecânica associada a avulsão do plexo braquial e a hiperalgesia inflamatória induzida por CFA.

Para a hipernocicepção mecânica induzida por zymosan as inibições máximas foram com percentuais de 25±13%, 56±14% e 63±13%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg da oleorresina de *C. duckei,* respectivamente. As inibições da indometacina e da dexametasona foram de 38±12% e 58±15%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose-dependente, com valor de DI_{50} de 4,614 mg/kg "0.6464 – 44.030"; R^2: 0,928).

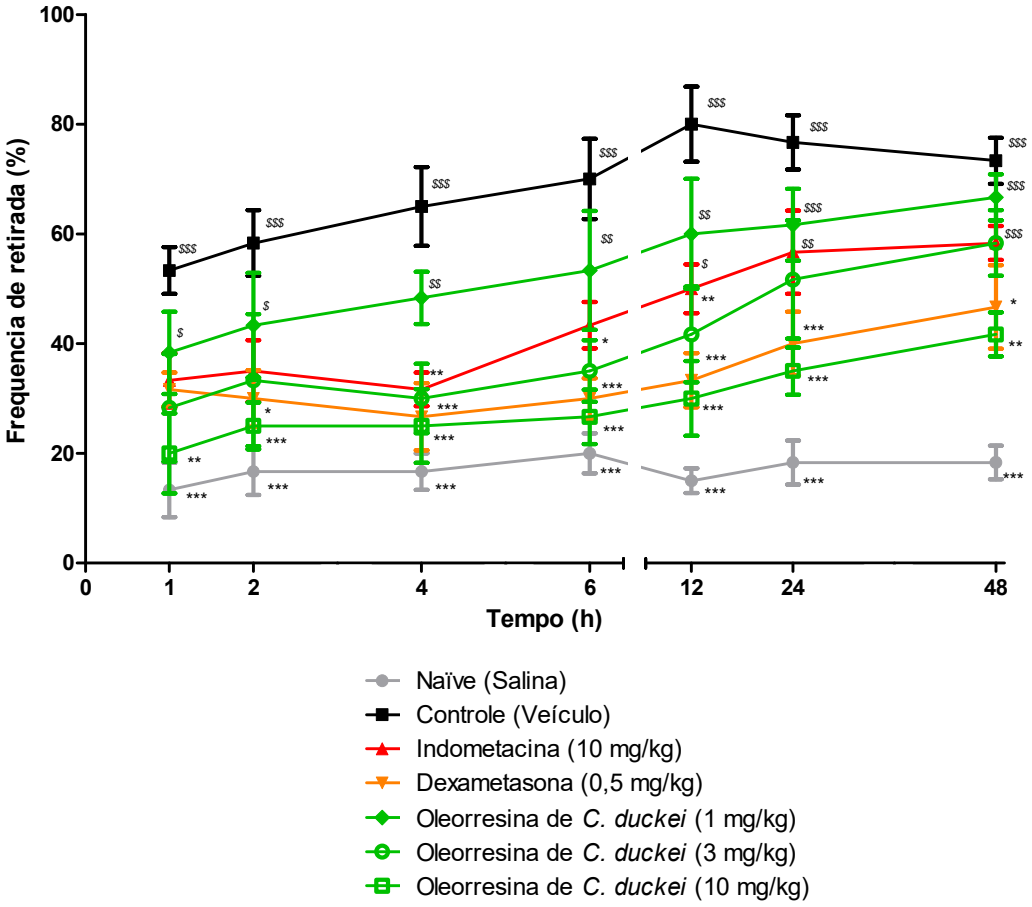


Figura 43. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Já as doses de 1, 3 e 10 mg/kg no tratamento com o ácido poliáltico apresentaram inibições máximas com percentuais de 25±12%, 41±12% e 74±16%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose-dependente, com valor de DI_{50} de 5,187mg/kg ("0.9300 – 28.93"; R^2: 0,975).

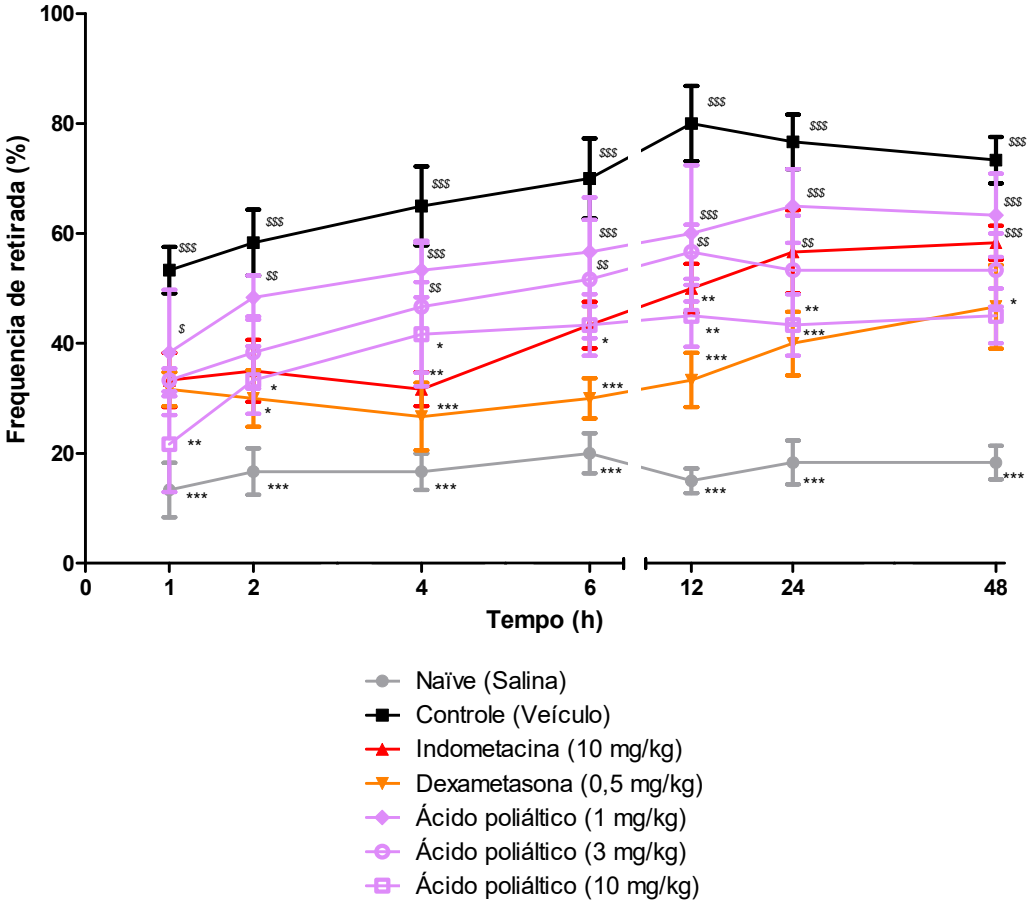


Figura 44. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($^{\$}$p<0,05, $^{\$\$}$p<0,01 e $^{\$\$\$}$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Os resultados obtidos nos experimentos de hiperalgesia, associados aos resultados presentes na avaliação da nocicepção aguda, e comparados com dados da literatura contribuem para a hipótese de que as substâncias presentes na oleoresina de *Copaifera* spp. inibem processos hipernociceptivos, a nível periférico interferindo na modulação de mediadores anti-inflamatórios (GOMES et al., 2010,

2007; VEIGA-JÚNIOR et al., 2001; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). Sugere-se, portanto, que a atividade anti-nociceptiva periférica, bem como, a atividade anti-inflamatória possa estar ativamente envolvida na modulação do processo de hipernocicepção.

5.6.6 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia mecânica associada à avulsão de plexo braquial (APB)

O plexo braquial é formado a partir nos nervos espinhais das últimas 4 vértebras cervicais (C5 a C8), e da primeira toráxica (T1), derivados das raízes dorsais e ventrais. As raízes dorsais, como o próprio nome sugere, possuem fibras sensoriais originadas dos gânglios da raiz dorsal, e as raízes ventrais possuem fibras com funções motoras. Os nervos originados do plexo braquial são plurissegmentares, pois possuem fibras originadas em mais de um segmento medular, originados de ramos espinhais de 3 troncos: superior, médio e inferior (ANAND; BIRCH, 2002; JOHNSON et al., 2010).

A lesão do plexo braquial é caracterizada pela ruptura do nervo por uma lesão fechada resultante da tração do ombro (HANINEC et al., 2007; RANKINE, 2004; WALLACE et al., 1996). Acidentes automobilísticos, tais como acidentes de motocicleta, bicicleta e atropelamentos são as causas mais comuns da origem desta lesão (GREGORY et al., 2009; WAIKAKUL; WAIKAKUL; PAUSAWASDI, 2000), resultando em alterações patológicas importantes que induzem ao estabelecimento da dor neuropática (CARVALHO; NIKKHAH; SAMII, 1997).

A lesão é causada pela avulsão intratável da raiz medular, que produz dor com característica constante, intermitente e incapacitante. A dor acomete a região do ombro e supra-escapular, com irradiação para o membro superior ipsilateral, porém acompanhado de distúrbios da sensibilidade evidenciada em locais distantes da lesão, principalmente em membros superiores e inferiores (ANAND; BIRCH, 2002; BERMAN; BIRCH; ANAND, 1998; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; FRAMPTON, 1996; PARRY, 1980). Os sintomas incluem distúrbios da sensibilidade como parestesias, déficits motores e alterações dos reflexos miotáticos, acompanhados de distúrbios psiquiátricos, tais como ansiedade e depressão, que contribuem para o agravamento do quadro clínico (ANAND; BIRCH, 2002; PARRY, 1980). Esta lesão pode desencadear plasticidade exacerbada do SNC, associada a sensibilidade dolorosa aumentada (CARVALHO; NIKKHAH; SAMII, 1997)

No momento da lesão nervosa ocorre sensibilização das fibras sensoriais devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias em resposta à destruição e remoção de axônios, células de Schwann e da micróglia destruídas. Estas citocinas contribuem para o desenvolvimento e estabelecimento da dor neuropática (MOALEM; TRACEY, 2006; SOMMER et al., 2001; STOLL; JANDER; MYERS, 2002). A exposição ao TNF-α pode resultar na ativação das caspases (p55 e p75), que induzem a síntese do NF-κB e resultam em apoptose, respectivamente. Estas duas proteínas estão envolvidas em respostas inflamatórias e nociceptivas agudas e crônicas (BAUD; KARIN, 2001; EPSTEIN; BARNES; KARIN, 1997; MICHEAU; RG TSCHOPP, 2003; MOALEM; TRACEY, 2006).

O TNF-α atua como modulador das primeiras alterações degenerativas durante a lesão do nervo periférico, induzindo lesão nos axônios, recrutamento de macrófagos e atividades ectópicas em nervos periféricos (LI; LIN, 2008; LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001a, 2001b; PERKINS; TRACEY, 2000; SCHÄFERS et al., 2003; SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002), podendo estar envolvido em respostas hipernociceptivas associadas a lesão (PARRY, 1980; QUINTÃO et al., 2006; RODRIGUES-FILHO et al., 2003).

Embora recentes avanços tenham ocorrido nas técnicas cirúrgicas para melhora de pacientes com lesão do plexo braquial, ainda não está disponível um tratamento eficaz. As opções cirúrgicas incluem enxerto e transplante, mas dependem do nível de lesão e do estabelecimento de um diagnóstico rápido e correto (CARLSTEDT et al., 2000). As terapias farmacológicas incluem o uso de analgésicos potentes, sendo que o tratamento usual inclui psicoterapia, além de reabilitação física. Porém, a dor é persistente e incapacitante, o que impossibilita o retorno do paciente às atividades habituais (CARVALHO; NIKKHAH; SAMII, 1997; FRAMPTON, 1996; PARRY, 1980).

Neste modelo os animais foram avaliados do 30º após o procedimento cirúrgico, onde iniciou-se os tratamentos. Nas **Figuras 45**, **46**, **47** e **48** observa-se que o tratamento com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico foi capaz reduzir de forma significativa a hiperalgesia mecânica quando comparados aos animais do grupo controle em todas as três doses avaliadas. Já os grupos tratados com as maiores doses exibiram uma resposta anti-nociceptiva muito próxima ao da gabapentina.

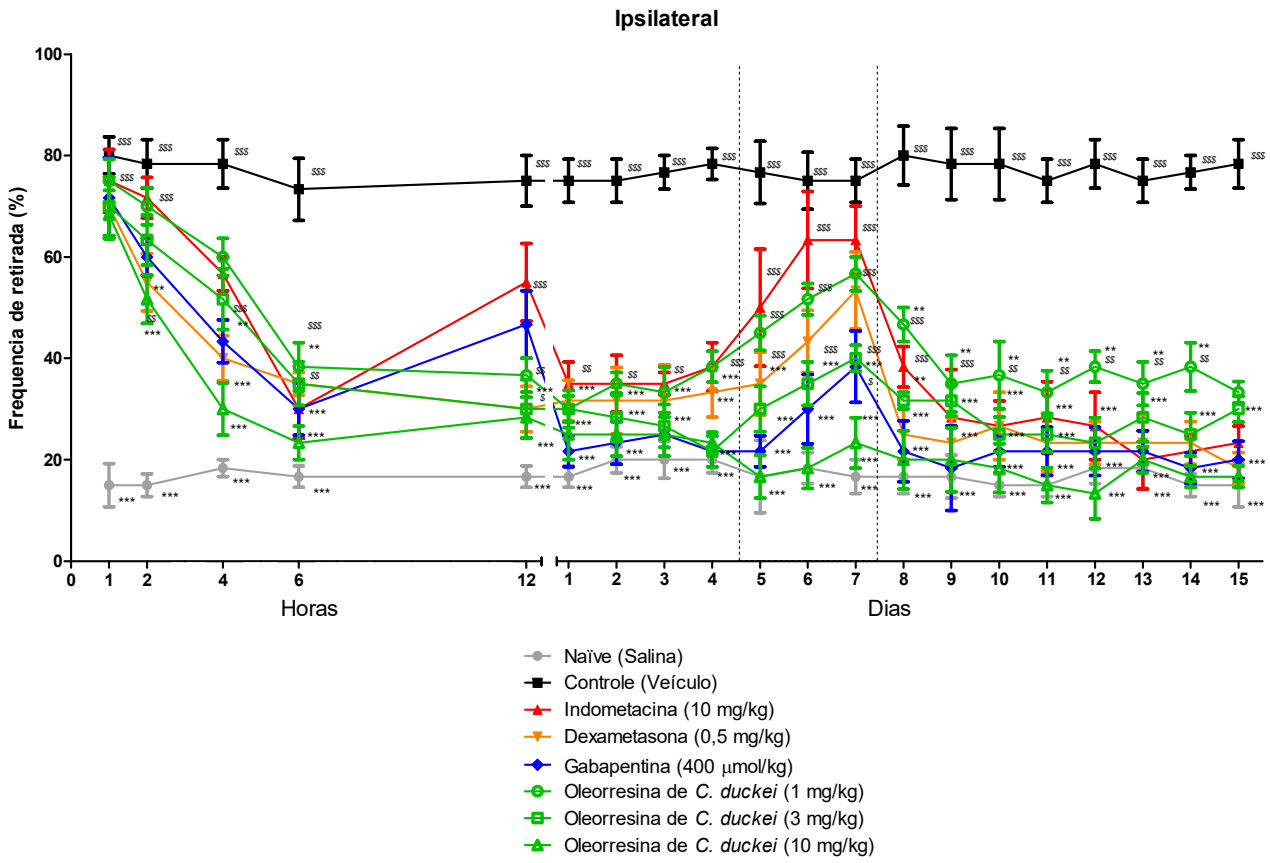


Figura 45. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira ipsilateral. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

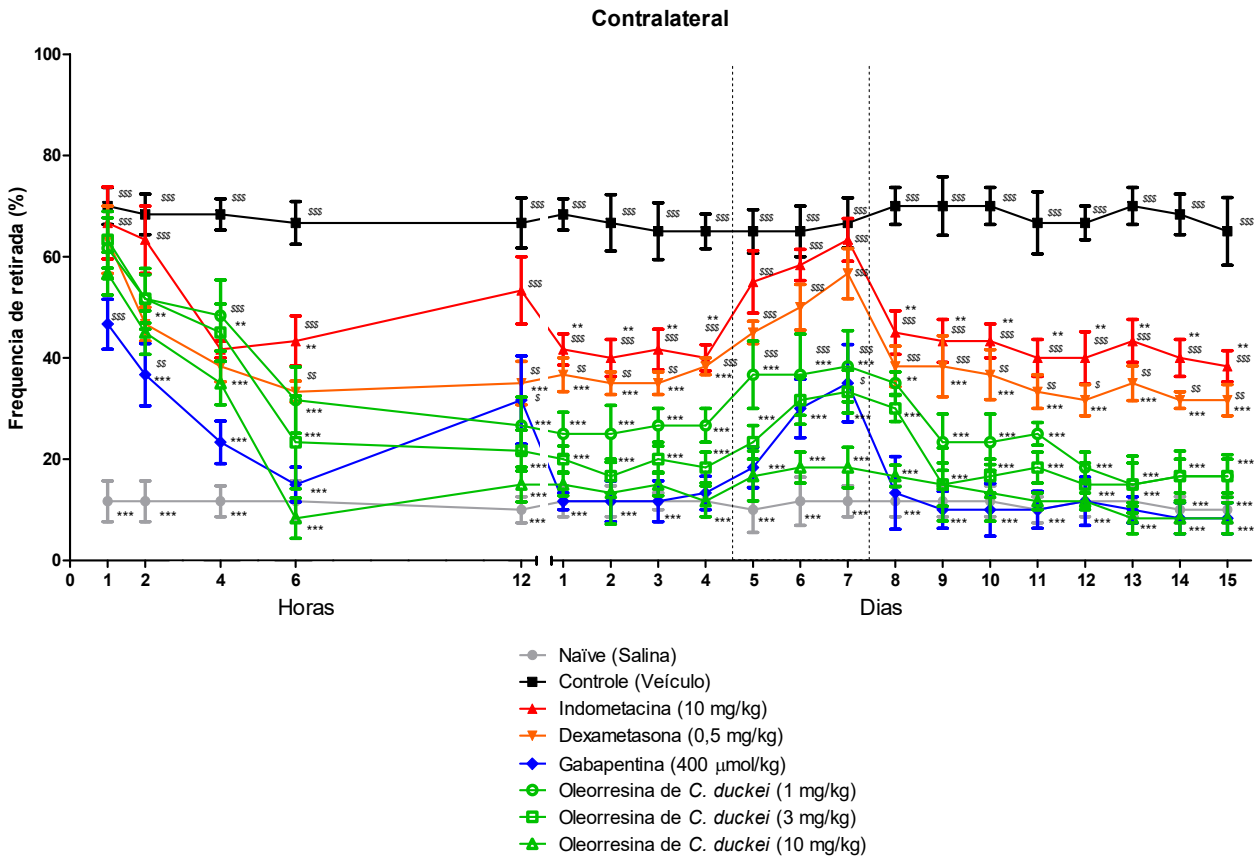


Figura 46. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira contralateral. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

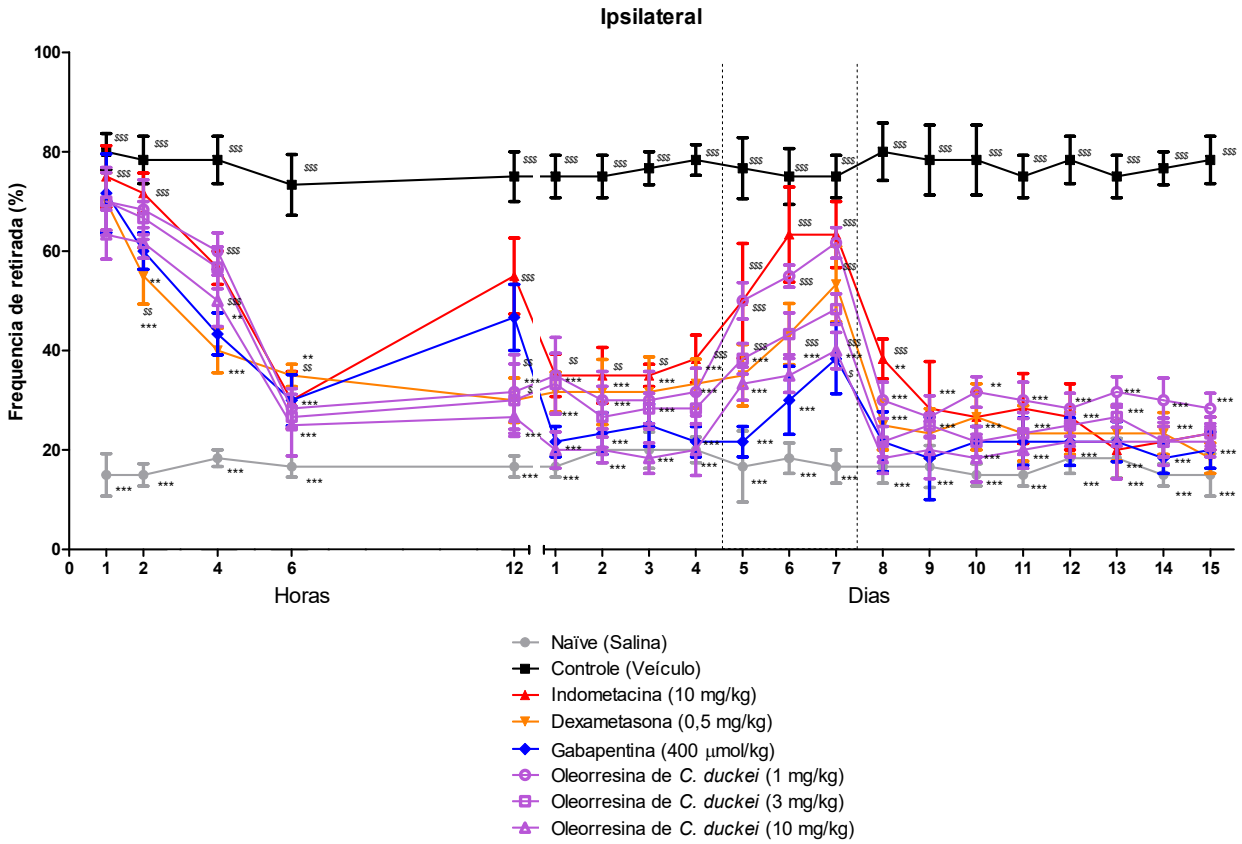


Figura 47. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira ipsilateral. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

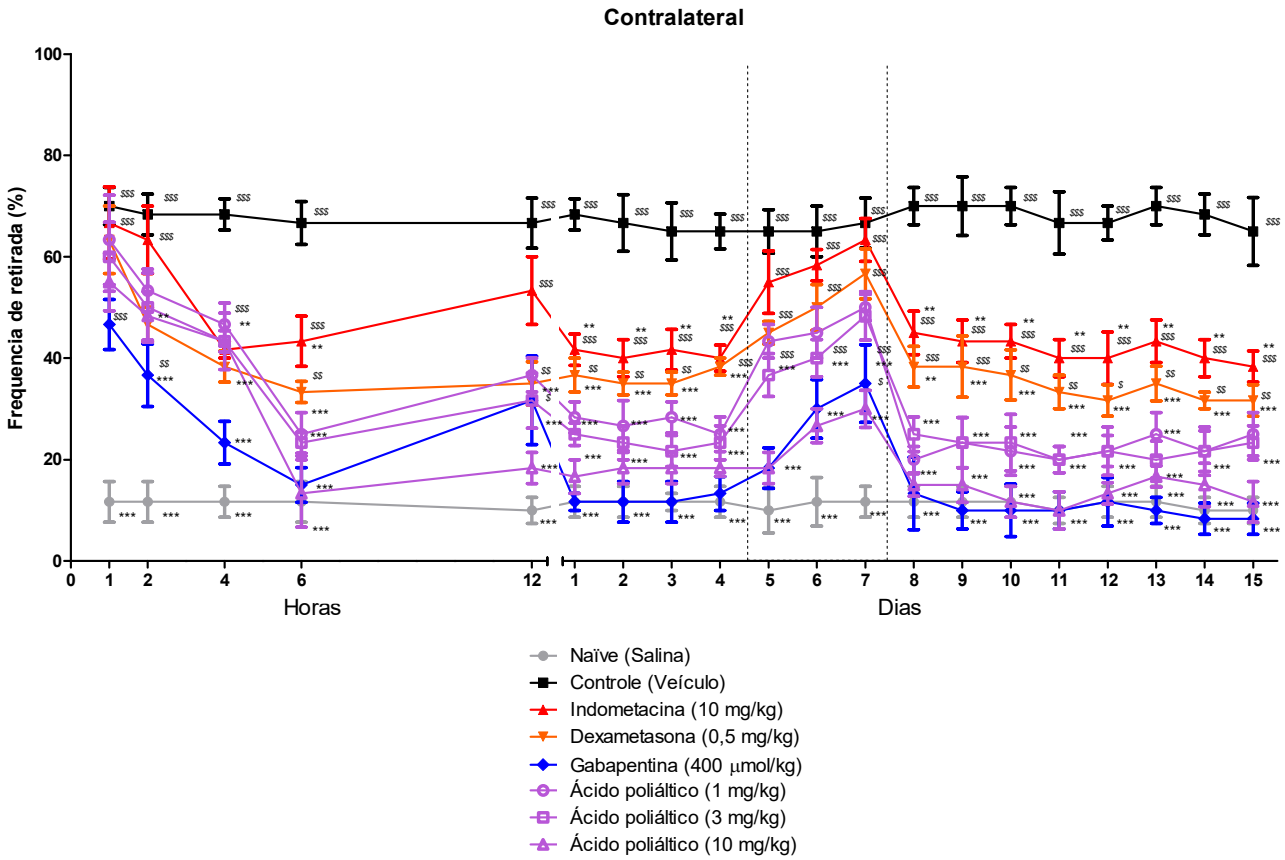


Figura 48. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia mecânica no teste de von Frey induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos. Pata traseira contralateral. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Vale ressaltar ainda, que o tratamento diário foi empregado para avaliação dos animais em diferentes intervalos de tempo no primeiro dia de tratamento. Esta avaliação permitiu verificar o tempo de duração do efeito anti-hiperalgésico, o qual teve seu pico máximo na sexta hora após o tratamento.

Com o objetivo de investigar a extensão do efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico o tratamento foi interrompido durante três dias, onde observam-se que os animais antes tratados retornaram a resposta semelhante ao grupo controle, com exceção da maior dose.

Além das atribuições populares, na literatura científica é possível encontrar muitos trabalhos com as oleorresinas de espécies do gênero *Copaifera* e suas atividades anti-inflamatórias (CARVALHO et al., 2005; GOMES et al., 2010; LUCCA et al., 2015; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007; VIEIRA et al., 2008).

A atividade anti-inflamatória pode ser atribuída aos sesquiterpenos, tais como o α-humuleno e β-cariofileno (FERNANDES et al., 2007) e aos diterpenos ácidos (GOMES et al., 2010; LEANDRO et al., 2012; OHSAKI et al., 1994; VARGAS et al., 2015; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007).

Os terpenos são uma das maiores classes de produtos naturais, e apresentam as mais variadas atividades biológicas, em especial efeitos farmacológicos, tais como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiulcerogênicos, antivirais, cardio e hepatoprotetores e analgésicos (BAKKALI et al., 2008; DZUBAK et al., 2006; MALHEIROS et al., 2001; MENDES et al., 2000).

Além de ser resultado dos efeitos anti-inflamatórios, a analgesia promovida pelos terpenos pode ser decorrente de efeitos sedativos, anti-espasmódicos, miorrelaxantes e anestésico local (DZUBAK et al., 2006), e podem estar relacionados alterações em nociceptores (localizados nas fibras Aβ, Aδ e fibras C), em receptores (glutamatérgicos), na trandução de sinais (alteração nos potenciais de repouso e gradientes de concentração), em receptores de potencial transitório (TRPV), mediadores químicos (5-HT, BK, ATP, NGF), alterações e inibições enzimáticas (5-LOX, COX e PLA_2) e em canais de íons controlados por voltagem (Na^+, K^+ e Ca^{2+}) (BAKKALI et al., 2008; GERSHENZON; DUDAREVA, 2007; PADUCH et al., 2007; SCHEIDT et al., 2002; VALÉRIO et al., 2007).

A atividade anti-inflamatória dos diterpenos ácidos – cauranos e labdanos, componentes majoritários da oleorresina de *C. duckei*, está associada a redução da produção NO e TNF-α, inibição da expressão de NOSi e COX-2 ao nível da transcrição

(FURTADO et al., 2015; GOMES et al., 2010; LEANDRO et al., 2012; SANTIAGO et al., 2015; VEIGA-JUNIOR et al., 2006), e regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-10 e IL-6, atenuando vias inflamatórias mediadas pelo NF-κB (LEANDRO et al., 2012; SANTIAGO et al., 2015).

5.6.7 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre o edema de pata

O edema causado pela carragenina, dextrana, LPS ou zymosan é consequência da ação sinérgica de vários mediadores que aumentam a permeabilidade celular através da vasodilatação, resultando no aumento de fluxo sanguíneo e migração de células polimorfonucleares (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; VAJJA et al., 2004; XU et al., 2012).

Os mediadores presentes no exsudato que influenciam as células responsivas ao processo inflamatório mais comuns são a histamina, bradicinina, leucotrienos, substância P, componentes do sistema complemento, PAF, entre outros. Estes favorecem o aumento da permeabilidade capilar ao plasma e o extravasamento de proteínas e células (MEDZHITOV, 2008; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

O transporte do exsudato ocorre através dos vasos linfáticos até os gânglios linfáticos ou tecidos linfoides locais, onde se inicia a resposta imune. O edema é a característica mais marcante da inflamação aguda, sendo associado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação, resultando em acentuada perda de líquidos e seu acúmulo para o tecido intersticial (CUENI; DETMAR, 2008; HOGG, 2004; OLIVER; ALITALO, 2005).

O edema de pata induzido por carragenina foi desenvolvido por Winter, Risley e Nuss, (1962), sendo um modelo trifásico e amplamente utilizado em estudos de inflamação. Entretanto, esse modelo não caracteriza o efeito anti-inflamatório como um todo, mas fornece resposta somente sobre o extravasamento vascular (edema) (POSADAS et al., 2004; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Neste ensaio foi investigada a atividade antiedematogênica da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico em resposta à injeção intraplantar de carragenina (300 µg; 20 µL/pata). Os resultados obtidos (**Figura 49**) demonstraram que a oleoresina de *C. duckei* apresenta atividade dose-tempo-dependente. O tratamento oral dos animais com a oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, inibe em 42±8%,

50±12% e 64±18% respectivamente, o edema. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), utilizadas como controles, também inibiram de forma significativa a resposta edematogênica com porcentagens de 47±19% e 71±17% respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 20,60 mg/kg ("1,290 - 49,087"; R^2: 0,789).

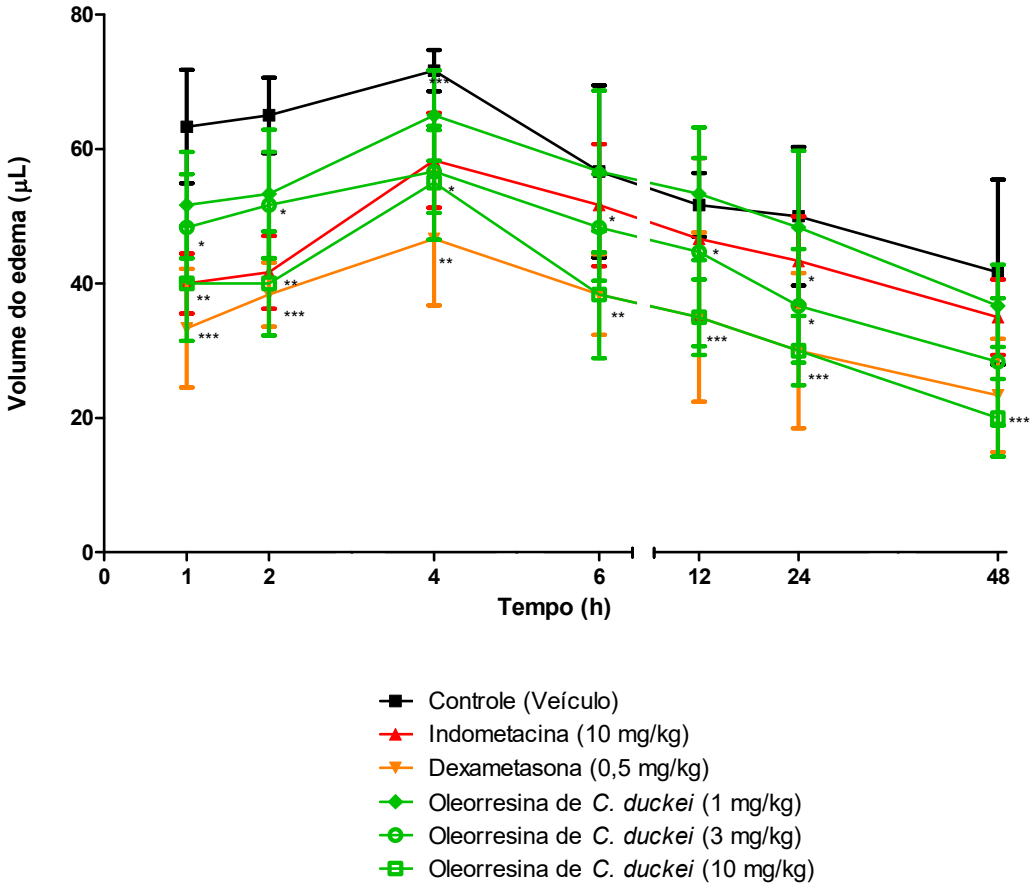


Figura 49. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada *linha* representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Já o ácido poliáltico (**Figura 50**) apresenta atividade dose-tempo-dependente. O tratamento oral dos animais nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, causou inibição de 48±9%, 55±15% e 66±13% respectivamente, sobre o edema. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) utilizadas como controle também inibiram de forma significativa a resposta edematogênica com porcentagens de

53±11% e 66±15%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 17,09 mg/kg ("2,238 – 30,552"; R^2: 0,823).

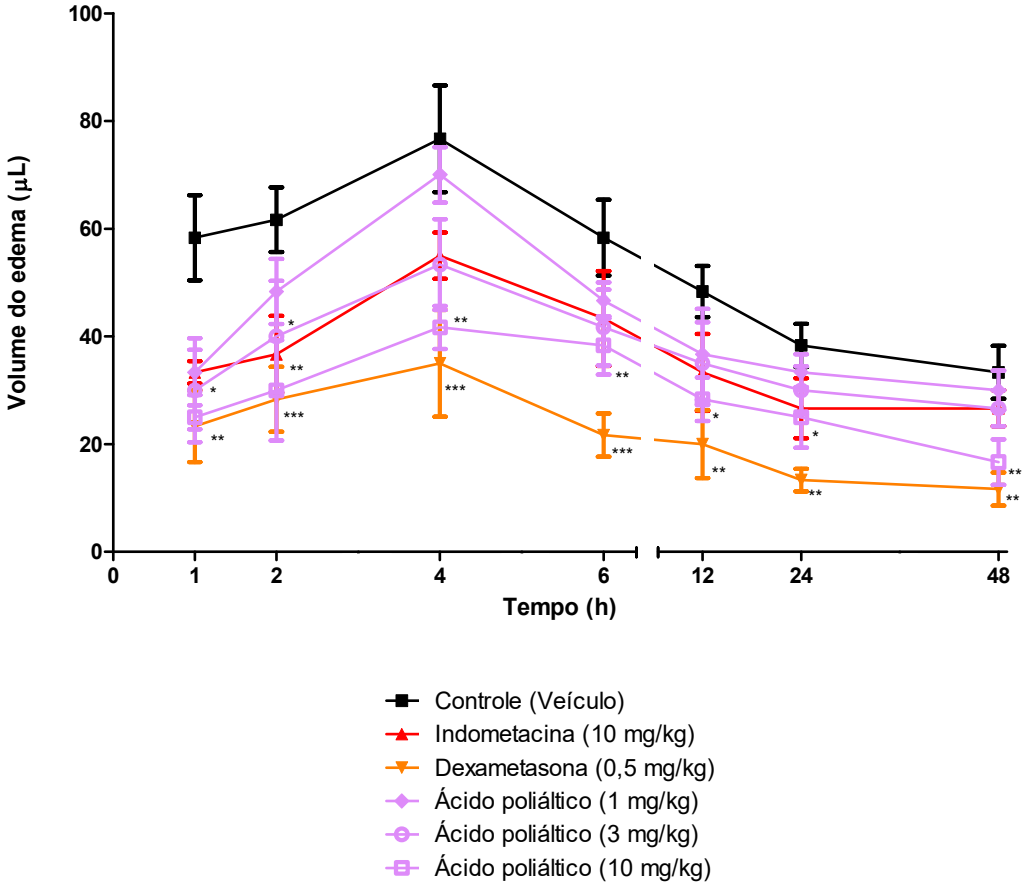


Figura 50. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de carragenina 300 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Conforme já discutido anteriormente, a dextrana é um polissacarídeo que induz reações anafiláticas caracterizadas por extravasamento e formação de edema, formados pela liberação de histamina e serotonina dos mastócitos (FURTADO et al., 2015; PARRATT; WEST, 1958; VAN WAUWE; GOOSSENS, 1989).

Existe correlação com a concentração total de histamina no exsudato e o grau de edema produzido pela dextrana (SHINICHI; KYOICHI; SETSUO, 1978, 1979). A histamina é um dos mediadores mais importantes na inflamação e atua como potente vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular, ativando o sistema complemento e células endoteliais, recrutando leucócitos, bem como estimulando

diretamente ou indiretamente neurônios na resposta inflamatória, o que também pode resultar em respostas nociceptivas (AMANN et al., 1995; LINARDI et al., 2000).

A histamina apresenta importante papel na transmissão da dor. Neurônios com receptores histaminérgicos são encontrados no núcleo dorsal da rafe e ACP, os quais se originam do hipotálamo e possuem importante papel na modulação da dor através de receptores histaminérgicos do tipo H_1 e H_2 (HOUGH; RICE, 2011; HOUGH, 1988; HOUGH et al., 1998).

A serotonina (5-HT) é liberada pelas plaquetas e interage com, pelo menos, 14 tipos de receptores que estão amplamente distribuídos por diversos tecidos. O receptor 5-HT3, presente nos gânglios da raiz dorsal e perifericamente, apresenta efeito antinociceptivo, enquanto a administração intratecal de antagonistas do receptor 5-HT3 bloqueia a analgesia induzida pela 5-HT e produz uma moderada resposta hiperalgésica. Já na inflamação, atua também como mediador de fase inicial relacionado com os eventos vasculares do processo inflamatório agudo (GIORDANO; GERSTMANN, 2004; OKUSE, 2007; TABER; LATRANYI, 1981).

Nesse estudo, foi demonstrado que a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliático inibiram o edema induzido por dextrana, corroborando com a fase inicial do edema induzido pela carragenina, este mecanismo pode estar relacionado com intervenção na degranulação de células inflamatórias e liberação das aminas vasoativas.

Os resultados obtidos (**Figura 51**) demonstraram que a oleoresina de *C. duckei* apresenta atividade dose-tempo-dependente. O tratamento com a oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, inibe em 23±7%, 28±14% e 45±6% respectivamente, o edema. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), utilizadas como controles, também inibiram de forma significativa a resposta edematogênica com porcentagens de 35±14% e 45±11%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 22,445mg/kg ("0.7397 – 8.084"; R^2: 0,715).

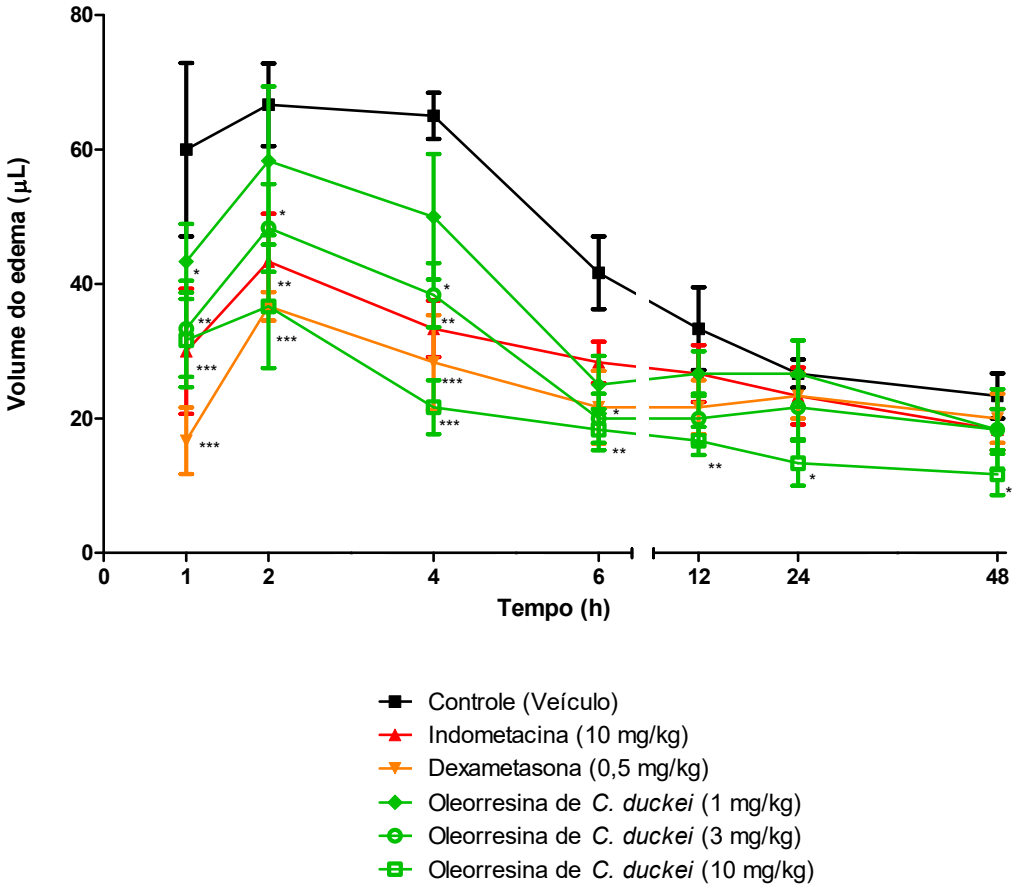


Figura 51. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada *linha* representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Neste ensaio, o ácido poliáltico (**Figura 52**) apresenta atividade dose-tempo-dependente. O tratamento oral dos animais com a oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, causou inibição de 30±15%, 43±14% e 53±14% respectivamente, sobre o edema. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 18,5914 mg/kg ("0.05666 to 66.173"; R^2: 0,814).

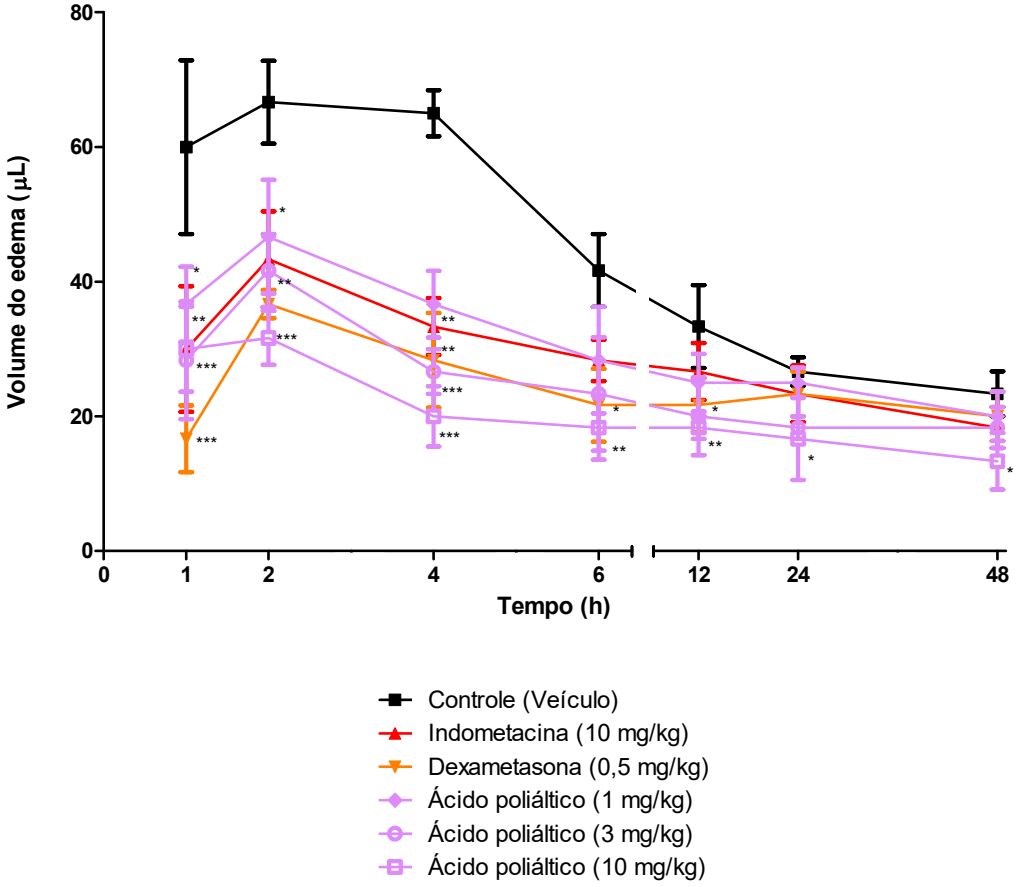


Figura 52. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de dextrana 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

O LPS é o principal causador de respostas inflamatórias sistêmicas tóxicas, caracterizada pela presença de macrófagos residentes, e principalmente por citocinas (VAJJA et al., 2004) . Durante as infeções, os microorganismos Gram-negativos que possuem esse lipopolissacarídeo ligam-se na membrana das células inflamatórias, tais como monócitos e neutrófilos através de receptores do tipo Toll (TLR), induzindo a produção de citocinas como TNF-α, IL-1β, IL-6, KC/CXCL1, MCP-1 (AKIRA; SATO, 2003; TAKEDA; AKIRA, 2004; TAKEUCHI; AKIRA, 2001).

Os resultados obtidos (**Figura 53**) demonstraram que a oleoresina de *C. duckei* apresenta atividade dose-tempo-dependente. As inibições máximas no edema induzido por LPS foram de 29±14%, 68±13% e 71±13%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg de oleorresina de *C. duckei* respectivamente. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e

a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), também inibiram de forma significativa a resposta edematogênica com porcentagens de 49±13% e 54±14% respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 21,720 mg/kg ("0.2721 – 61.908"; R^2: 0,847).

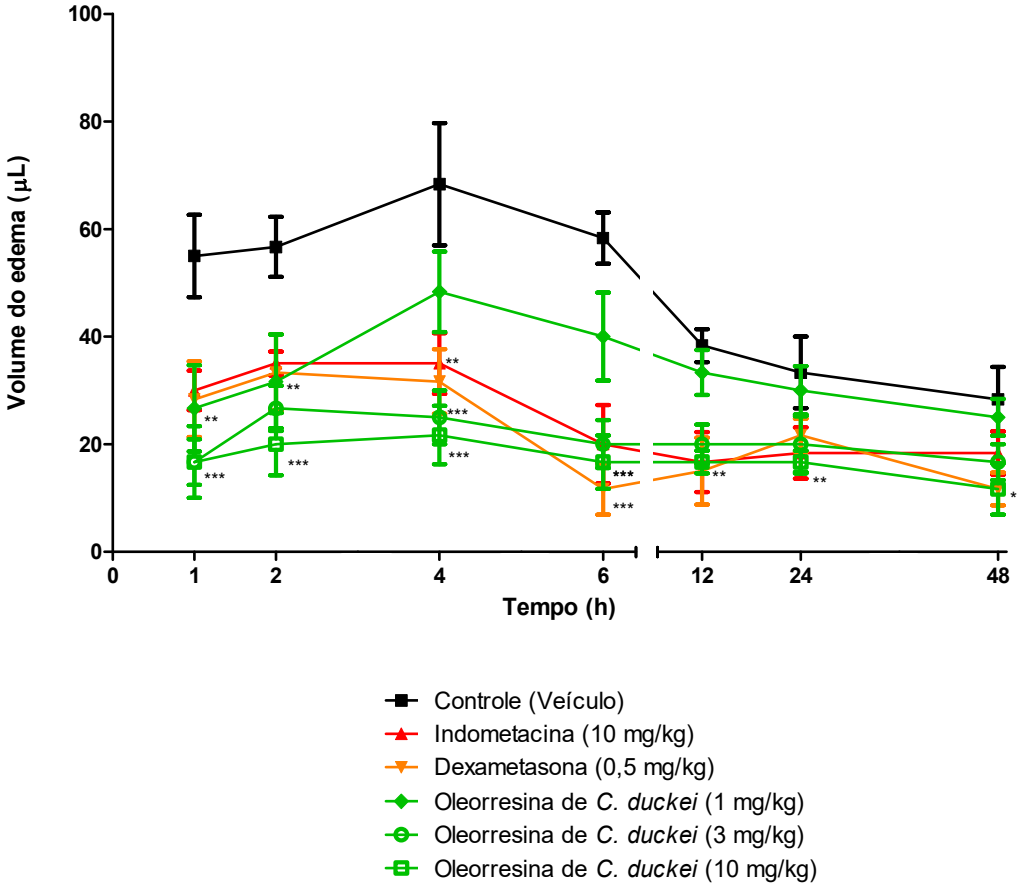


Figura 53. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

O ácido poliáltico (**Figura 54**) apresenta atividade dose-tempo-dependente. O tratamento oral dos animais com a oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, causou inibição de 32±15%, 44±14% e 54±12% respectivamente, sobre o edema. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 19,591 mg/kg ("0.05666 to 68.173"; R^2: 0,814).

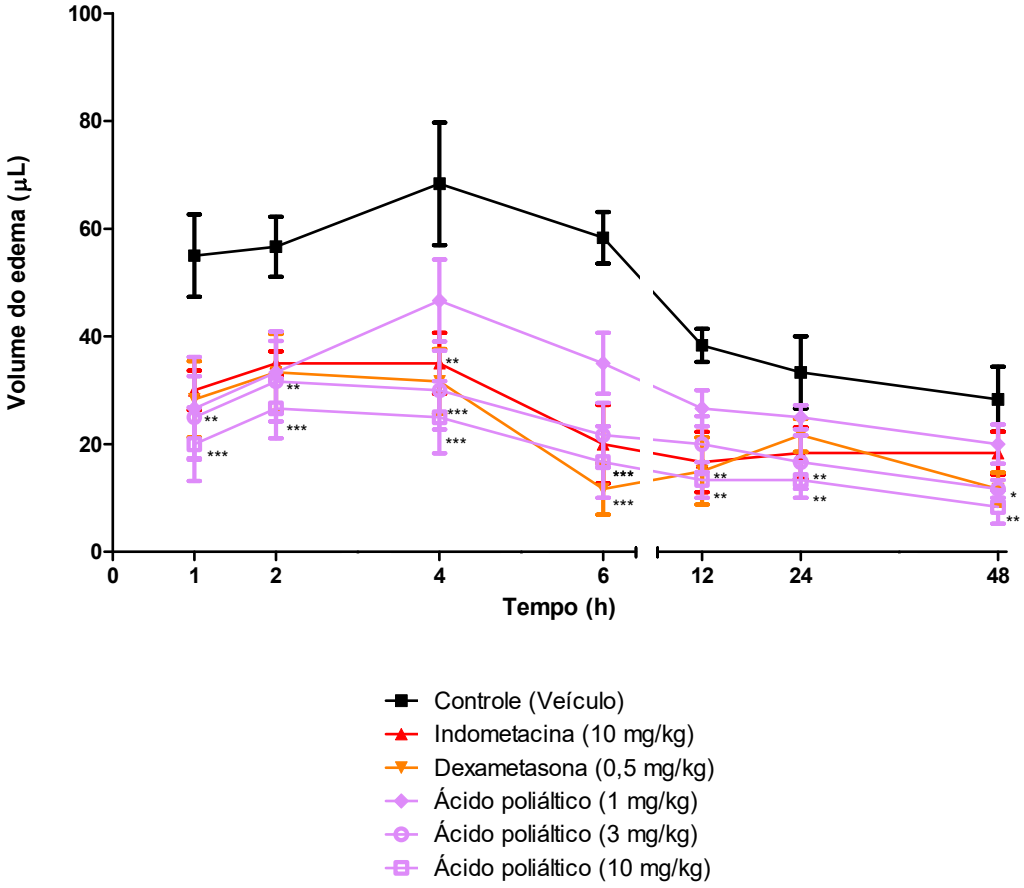


Figura 54. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de LPS 100 ng/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

A oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico foram capazes de inibir a formação do edema de pata induzido por LPS sugerindo, portanto, que sua atividade anti-inflamatória também esteja atuando em vias bioquímicas intracelulares que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Com base nos resultados acima discutidos, sugere-se que estes interfiram, de alguma forma, na produção e/ou ação de mediadores inflamatórios como PGs, NO e bradicinina e ainda inibição na produção de citocinas inflamatórias.

Já o zymosan, por sua vez, induz a liberação de diversos mediadores característicos em processos inflamatórios crônicos, tais como prostaglandinas,

leucotrienos e componentes do sistema complemento, fator de ativação plaquetária, ROS, TNF e IL-1β (FRASNELLI et al., 2005; KEYSTONE et al., 1977; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007), induzindo também a nocicepção visceral.

Ainda, no início dafase aguda da inflamação induzida por zymosan, produz o aumento da permeabilidade vascular, edema, extravasamento de proteínas plasmáticas e o infiltrado de células inflamatórias, dando início a geração de produtos derivados do ácido araquidônico (PAYÁ et al., 1996), sendo que este processo evolui para a cronicidade com degradação da cartilagem articular, do osso subcondral, com intensa sinovite e proliferação de linfócitos e monócitos (GEGOUT et al., 1995; ROCHA et al., 1999).

Os dados do presente estudo demonstram que a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico inibem de modo significativo e dose-tempo-dependente o edema induzido por zymosan.

Os resultados obtidos (**Figura 55**) demonstraram que a oleoresina de *C. duckei* apresenta atividade dose-tempo-dependente. No modelo de edema induzido por zymosan as doses de 1, 3 e 10 mg/kg de oleorresina de *C. duckei* inibem em 27±11%, 39±12% e 55±13%, respectivamente. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), inibiram de forma significativa a resposta edematogênica com porcentagens de 46±12% e 58±12% respectivamente.

O tratamento oral dos animais com a oleorresina de *C. duckei* nas doses, inibe em respectivamente, o edema. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 19,962 mg/kg ("4.308 to 23.03"; R^2: 0,840).

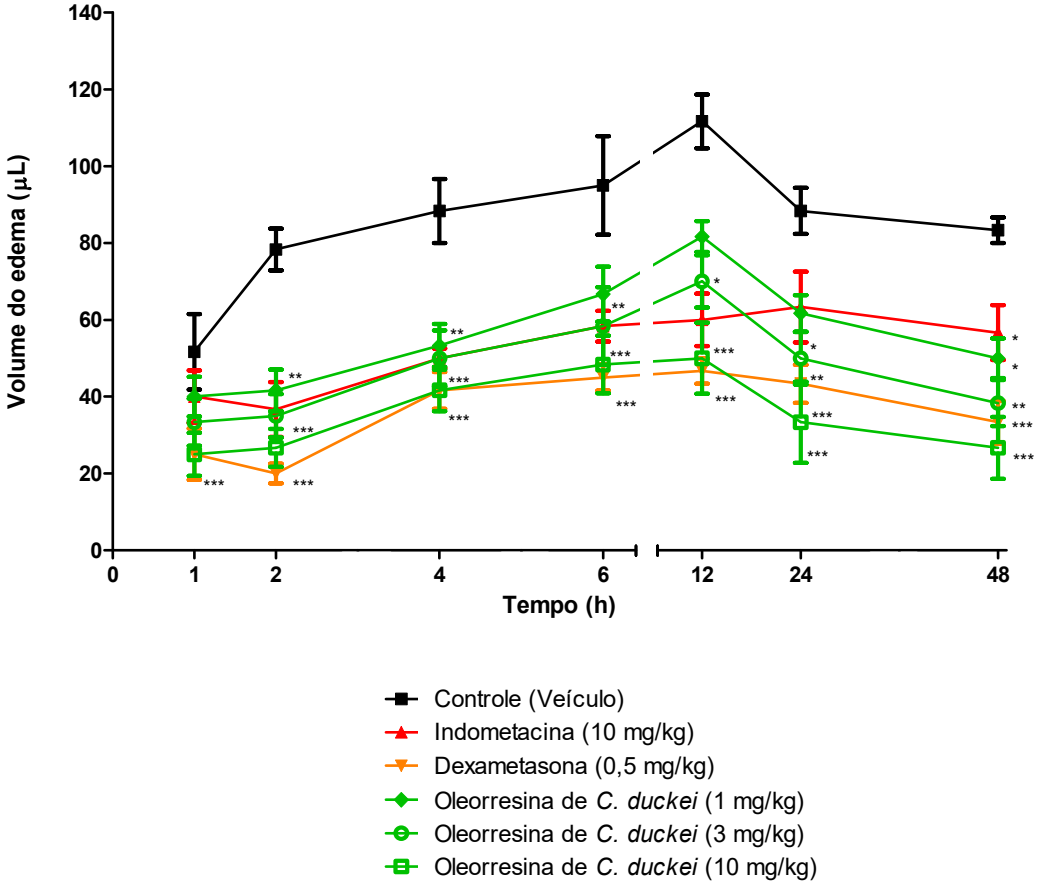


Figura 55. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

O ácido poliáltico (**Figura 56**), de maneira similar aos resultados observados nos ensaios de edema de pata induzida por carragenina, dextrana e LPS apresenta atividade dose-tempo-dependente. O tratamento oral dos animais com a oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, causou inibição de 37±12%, 43±11% e 57±11% respectivamente, sobre o edema. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 17,293 mg/kg ("3.756 - 22.99"; R^2: 0,839).

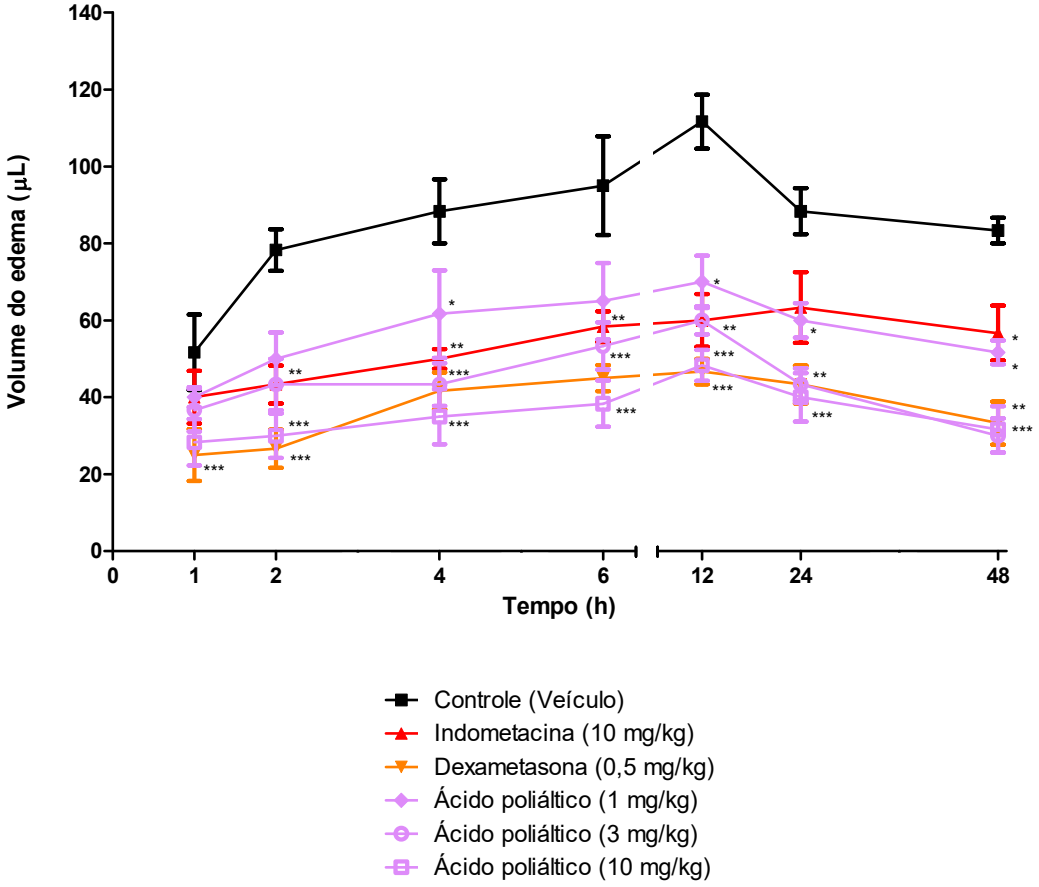


Figura 56. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o volume deslocado no teste de edema de pata induzida pela injeção de zymosan 100 µg/pata (0,01 mL/10 g de animal, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

Vale ressaltar que o pico da inflamação do zymosan ocorre mais tardiamente, como observados nas **Figuras 55** e **56**, devido ao tipo de inflamação que ocorre com a injeção do zymosan.

Diversos mediadores são produzidos em resposta à inflamação e estes são liberados de acordo com fase do processo. Em primeiro momento (até 1 hora após) ocorre a liberação de histamina e serotonina, seguida da liberação de bradicinina e em último momento (entre 4 e 6 horas), ocorre a liberação de PGE e ativação das enzimas COX e LOX, ocorrendo também a migração de células mononucleares (GRYGLEWSKI; BOTTING; VANE, 1988; KATZ et al., 1984; VAJDOVICH, 2008).

Estudos com a oleorresina de *C. multijuga* apresentam resultados com atividade antiedematogênica na dose de 30 mg/kg (GOMES et al., 2010). Veiga-Júnior

e colaboradores (2007) demonstraram que as oleoresinas de *C. cearensis*, *C. reticulata* e *C. multijuga* inibem a produção de óxido nítrico, o qual possui um importante papel regulatório nos estágios da inflamação, sendo produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado com potente ação vasodilatadora, levando ao aumento da permeabilidade vascular (GRYGLEWSKI; BOTTING; VANE, 1988). A oleorresina de *C. multijuga* apresentou-se mais efetiva, inibindo a produção de NO na concentração de 50 µg/kg (VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). A oleorresina de *C. duckei* previamente estudada para o ensaio de edema de para inibiu o edema somente na maior dose testada (1802 mg/kg), com inibição de somente 18% quando comparado ao controle. Essas diferenças encontradas entre este estudo e o estudo de Carvalho e colaboradores (2005) podem ser justificadas pelas diferenças na composição química das oleorresinas, resultado da influência de diversos fatores, tais como sazonalidade, fatores genéticos e/ou fisiológicos da planta, condições ambientais bióticas e abióticas, dentre outros (AKULA; RAVISHANKAR, 2011; PAVARINI et al., 2012; SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016; SCOGNAMIGLIO et al., 2015; SHULAEV et al., 2008).

Baseado nas informações acima, sugerimos que o possível efeito anti-inflamatório da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico, em modelos experimentais de inflamação aguda, tais como indução de edema de pata por diferentes agentes flogísticos, tais como carragenina, dextrana, LPS e zymosan, possa estar inibindo o edema e extravasamento vascular, o recrutamento de leucócitos, a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e produção de óxido nítrico (NO) e a nocicepção pelos modelos experimentais de testes das contorções abdominais pelo ácido acético, formalina e hiperalgesia induzida por carragenina, dextrana, LPS e zymosan.

5.6.8 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico no exudato da bolsa de ar (*Air pouch*)

O ensaio da bolsa de ar ou *Air pouch* é um modelo de estudo da inflamação aguda ou crônica *in vivo*. Descrito pela primeira vez por Selye (1953) e adaptado por Edwards e colaboradores (1981), consiste na injeção de ar estéril no dorso do animal, na área intra-escapular. A presença do ar favorece a formação de área que simula a cavidade sinovial, com a presença de elementos tais como macrófagos e fibroblastos.

Nesta bolsa é permitido o estímulo com diversos agentes flogísticos, permitindo a formação de um exsudato de fácil coleta, onde é permitida a contagem total e diferencial de leucócitos e a dosagem de mediadores relacionados ao processo inflamatório (ROMANO et al., 1997).

Inicialmente este trabalho previa o uso do ensaio de pleurisia, que consiste na injeção do agente flogístico na cavidade pleural, coletando-se o exsudato para determinação dos eventos relacionados ao processo inflamatório. Porém, após revisão da literatura, o ensaio da bolsa de ar apresenta maiores vantagens, entre elas a fácil execução, pois a administração na cavidade pleural necessita de cuidados para não romper o pulmão do animal, sendo a coleta de um exsudato na bolsa de ar mais "limpo", sem a presença de interferentes, tais como a presença de hemácias (SEDGWICK; LEES, 1986).

Este método é extremamente versátil, pois permite o uso de diversas variáveis, como alterações dos agentes flogísticos utilizados: carragenina, dextrana, zymosan, histamina, bradicinina, PGE_2, substância P, entre outros; alterações no tempo de exposição, como por exemplo onde o exsudato provocado pela carragenina é composto de polimorfonucleares nas primeiras 24 h com aumento gradual de células mononucleares até 48 horas; e dosagem de diferentes mediadores, tais como mieloperoxidade, citocinas e enzimas e produtos da formação de ROS (PAYÁ et al., 1996; ROMANO et al., 1997; SMITH et al., 1998).

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemeproteína expressa em altas concentrações em promielócitos. A medida que estas células vão se diferenciando, sua expressão diminui. É presente nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, apresentando poucas concentrações em monócitos. Uma de suas principais funções é produzir ácido hipocloroso (HOCl), que resulta em atividades microbicidas e apoptóticas. Os subprodutos do HOCl, tais como ROS possuem propriedades imunomodulatórias, estimulando a produção de citocinas e ativando quinases e outras enzimas (KLEBANOFF, 2005; KUMAR; PIEDRAFITA; REYNOLDS, 2004; SCHRECK; ALBERMANN; BAEUERLE, 1992).

De acordo com os resultados obtidos no modelo de edema de pata a atividade máxima da carragenina acontece em 4 h. Esse dado foi levado em consideração, sendo que a atividade anti-inflamatória da oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico foram investigados no modelo da bolsa de ar neste período.

Os resultados demonstram que há aumento significativo no número de leucócitos no local da inflamação nos animais do grupo controle. A oleorresina de *C. duckei* reduziu significativamente a migração de células para a bolsa, quando comparado ao grupo carragenina e seus efeitos foram similares à dexametasona (**Figura 57**).

O tratamento oral dos animais com a oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg inibe a migração de leucócitos em 71±12%, 79±7% e 87±6%, respectivamente. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) utilizadas como controle inibiram de forma significativa a migração com porcentagens de 45±15% e 85±5%, respectivamente. As inibições máximas ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 7,69 mg/kg ("1,024 - 37,784"; R^2: 0,804).

É possível observar no exudato uma diminuição da concentração da enzima mieloperoxidase (**Figura 58**), corroborando com a diminuição do número de leucócitos presentes na bolsa de ar, e confirmando as atividades anti-inflamatórias e antiedematogênicas observadas no teste de edema de pata induzido por carragenina.

As porcentagens de inibição máximas observadas sobre a dosagem da enzima mieloperoxidase foram de 74±11%, 80±13% e 88±11%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg, respectivamente. Os controles positivos indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) inibiram 86±12% e 93±11%, respectivamente.

O tratamento oral com o ácido poliáltico (**Figura 59**) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, inibe a migração de leucócitos em 62±22%, 64±10% e 84±4%, respectivamente. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) inibiram de forma significativa a migração com porcentagens de 44±16% e 89±11%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 2,423 mg/kg ("0,425 – 13,801"; R^2: 0,829).

De maneira similar, também se observa que no exudato dos animais tratados com o ácido poliáltico há diminuição da concentração da enzima mieloperoxidade (**Figura 60**), justificando a diminuição de leucócitos para a bolsa de ar inflamada. Para o tratamento com o ácido poliáltico nas doses de 1, 3, e 10 mg/kg as porcentagens de inibição máximas observadas sobre a dosagem da enzima mieloperoxidase foram de 62±13%, 68±15% e 76±12%.

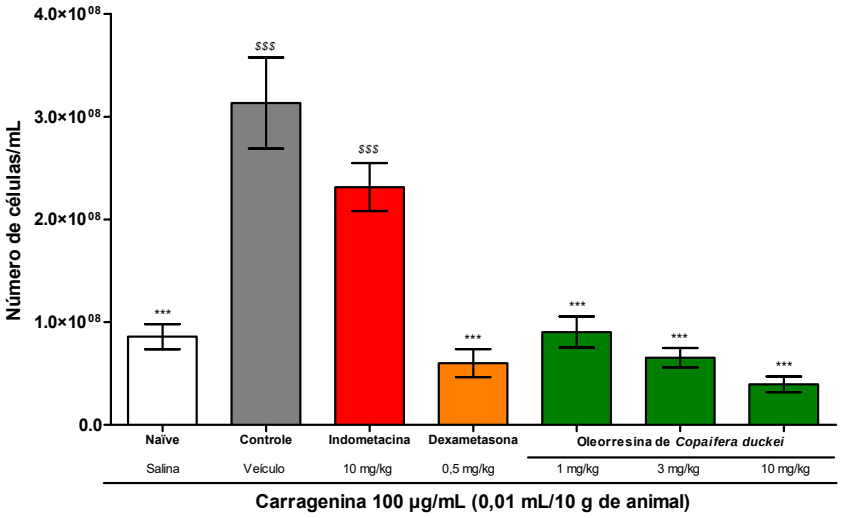


Figura 57. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

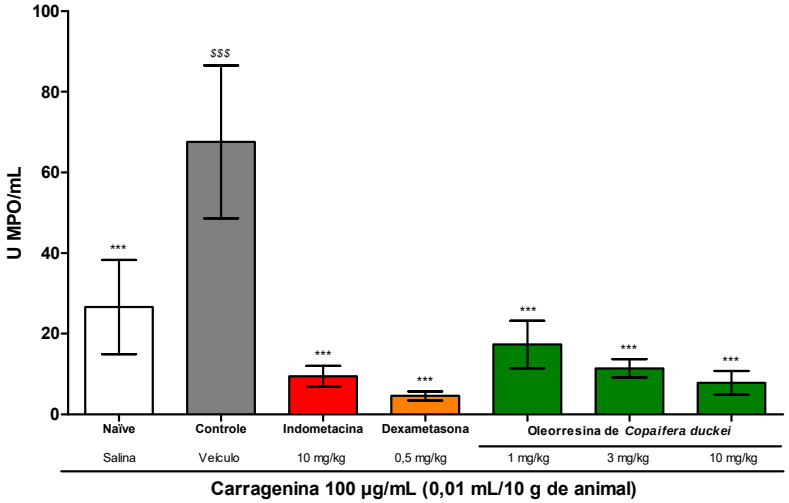


Figura 58. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre obre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

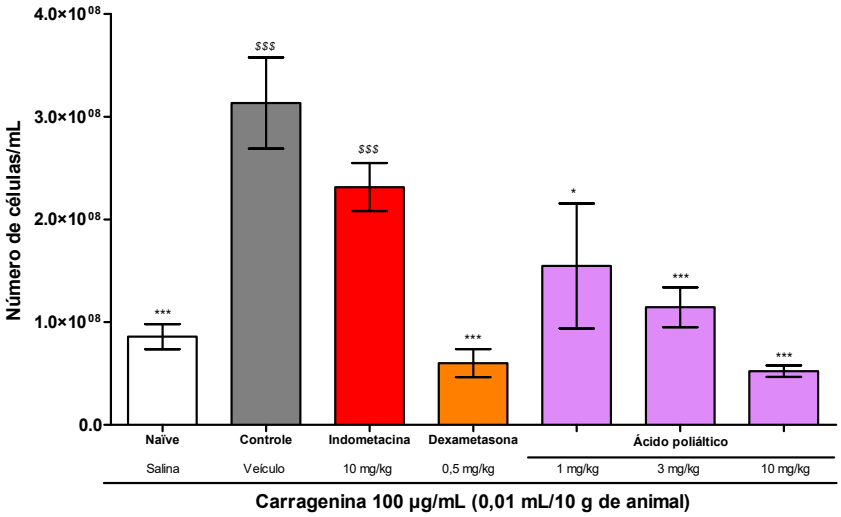


Figura 59. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

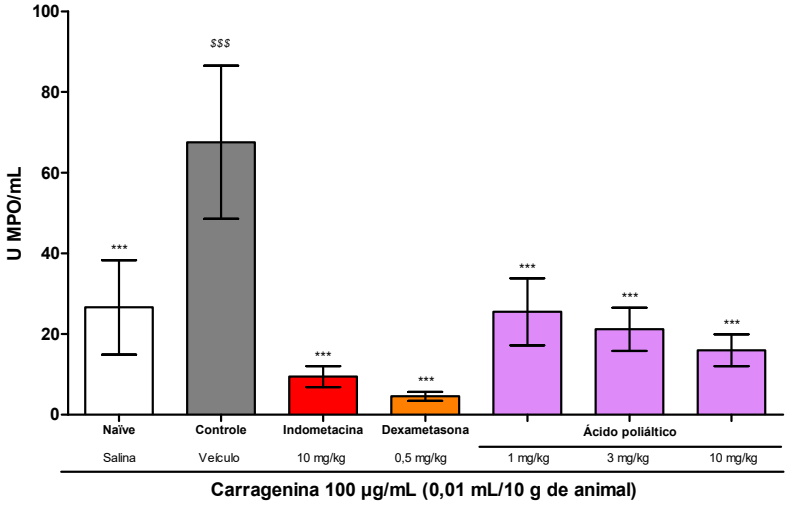


Figura 60. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de carragenina 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Conforme anteriormente discutido, a dextrana induz uma resposta inflamatória por osmose, aumentando o volume de líquido para o local da inflamação, em presença de aminas vasoativas derivadas dos mastócitos, a histamina e a serotonina, e ativação do sistema cinérgico (BASTOS et al., 2001; SHINICHI; KYOICHI; SETSUO, 1978, 1979; WIRTZ et al., 2007). De acordo com os resultados obtidos no modelo de edema de pata a atividade máxima da dextrana também acontece em 4 h, sendo este o tempo de exposição ao agente flogístico.

As doses de 1, 3 e 10 mg/kg da oleorresina de *C. duckei* inibiram a migração leucocitária para a bolsa de ar estimulada por dextrana em 46±11%, 54±8% e 72±12%, respectivamente (**Figura 61**). A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) utilizadas como controle inibiram de forma significativa a migração com porcentagens de 57±14% e 86±9%, respectivamente

A administração da nas doses de inibiu a migração leucocitária para a bolsa de ar através do estímulo com dextrana em respectivamente. As inibições máximas ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 14,763 mg/kg ("3,467 - 57,974"; R^2: 0,794).

Houve a diminuição da concentração de mieloperoxidade no exsudato (**Figura 62**), demonstrando que a atividade antiedematogênica e antiiflamatória está relacionada com a diminuição da migração leucocitária para o local da inflamação induzida por detrana. As porcentagens de inibição máximas observadas sobre a dosagem da enzima mieloperoxidase foram de 17±10%, 49±13% e 75±14%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg, respectivamente. Os controles positivos indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) inibiram 49±12% e 77±13%, respectivamente.

De maneira homóloga, o ácido poliáltico (**Figura 63**) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, inibiu a migração leucocitária em 34±10%, 52±16% e 72±12%, respectivamente. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) inibiram de forma significativa a migração com porcentagens de 56±14% e 91±11% respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 12,689 mg/kg ("2.457 – 47,576"; R^2: 0,903). Estes resultados também foram confirmados com a diminuição da concentração da mieloperoxidase nos animais tratados com o ácido poliáltico (**Figura 64**), onde as porcentagens de inibição máximas observadas sobre a dosagem da enzima mieloperoxidase foram de 35±11%, 65±15% e 88±12%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg, respectivamente.

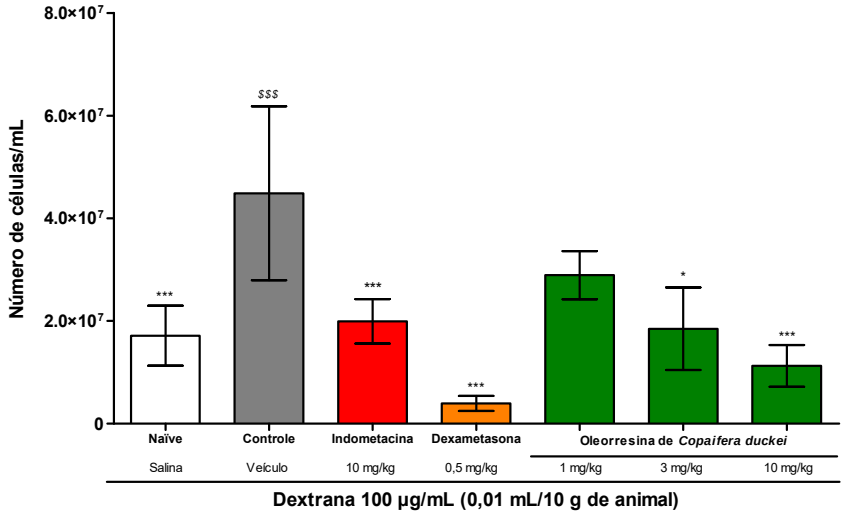


Figura 61. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de C. duckei, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg(1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

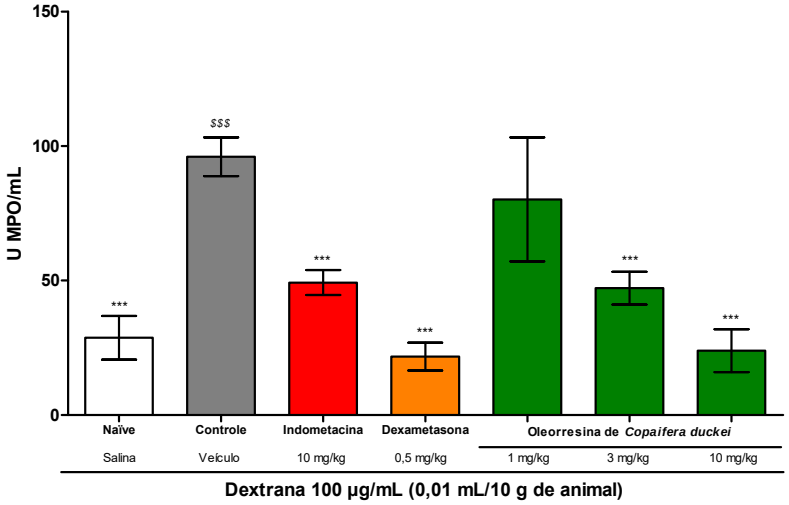


Figura 62. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre obre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

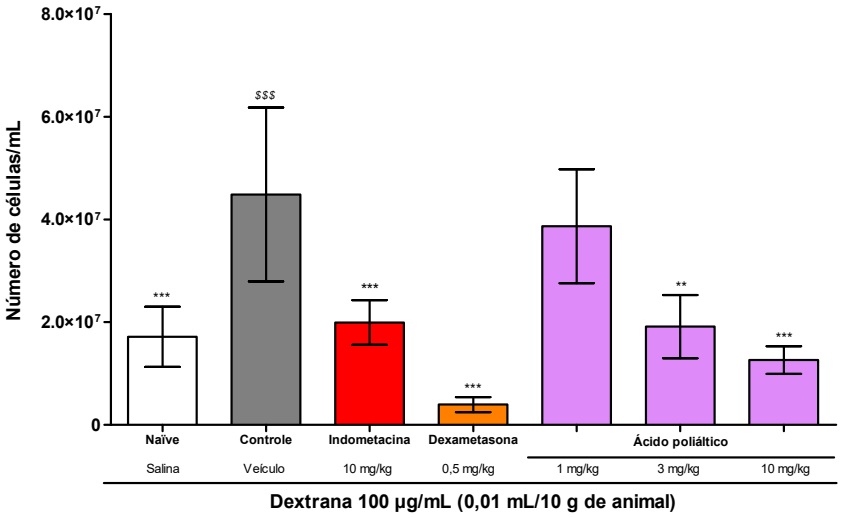


Figura 63. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

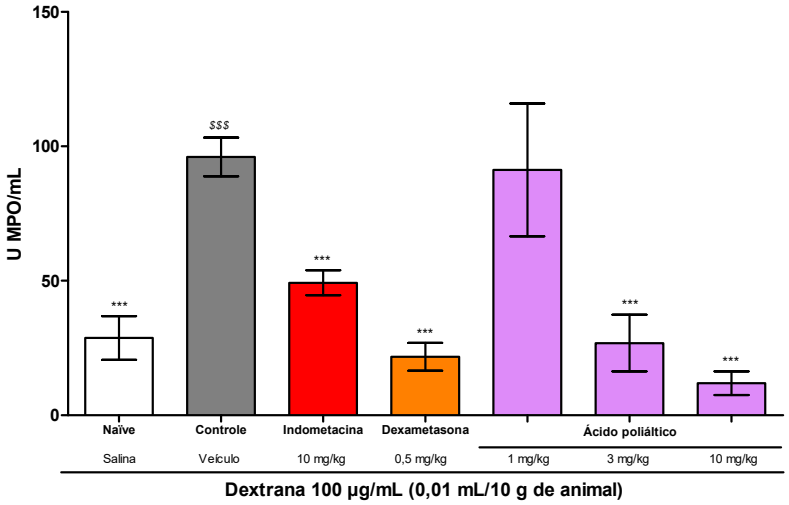


Figura 64. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de dextrana 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Já o estímulo por zymosan resultou em um aumento de células no exsudato da bolsa de ar, porém, embora esse aumento demonstrasse maior intensidade quando comparados com o número de células do infiltrado inflamatório produzidos pela carragenina e pela dextrana (FRASNELLI et al., 2005; TARAYRE et al., 1989).

O edema por zymosan é mediado pela ativação do sistema complemento, com produção de anafilotoxina C5a, um importante fator quimiotáxico de neutrófilos. A fase inicial da inflamação produzida pelo zymosan parece envolver a serotonina e leucotrienos, enquanto que a fase tardia envolve o PAF, NO e PGs (CUZZOCREA et al., 1996; GADÓ; GIGLER, 1991; GEGOUT et al., 1995). Baseando-se mais uma vez no ensaio de edema de pata induzida por zymosan, a atividade máxima do zymosan acontece em 12 h, sendo que este foi o tempo de exposição ao agente flogístico.

A oleorresina de *C. duckei* nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg inibiu a migração de leucócitos para a bolsa de ar através do estímulo com zymosan em 61±14%, 73±14% e 74±14%, respectivamente (**Figura 65**), após 12 horas. A indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) utilizadas como controle inibiram de forma significativa a migração com porcentagens de 81±12% e 83±12%, respectivamente. As inibições máximas ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 16,78 mg/kg ("3,687 - 56,367"; R^2: 0,905). Foram observadas a diminuição da concentração de mieloperoxidade no exsudato (**Figura 66**), corroborando com os resultados obtidos nos experimentos com carragenina e dextrana.

As porcentagens de inibição máximas observadas sobre a dosagem da enzima mieloperoxidase no teste de air pouch por zymosan foram de 35±18%, 52±12% e 89±12%, para as doses de 1, 3 e 10 mg/kg, respectivamente. Os controles positivos indometacina (1 mg/kg, v.o.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) inibiram 56±12% e 90±11%, respectivamente.

O ácido poliáltico (**Figura 67**) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, também inibiu a migração de leucócitos em 39±13%, 55±13% e 72±12%, respectivamente. As inibições ocorreram de forma dose dependente, com valor de DI_{50} de 14,132 mg/kg ("3,567 – 49,348"; R^2: 0,845). A concentração da mieloperoxidase nos animais tratados com o ácido polilíáltico também se encontra diminuída (**Figura 68**).

Para o tratamento com o ácido poliáltico nas doses de 1, 3, e 10 mg/kg as porcentagens de inibição máximas observadas sobre a dosagem da enzima mieloperoxidase foram de 46±17%, 62±16% e 79±12%.

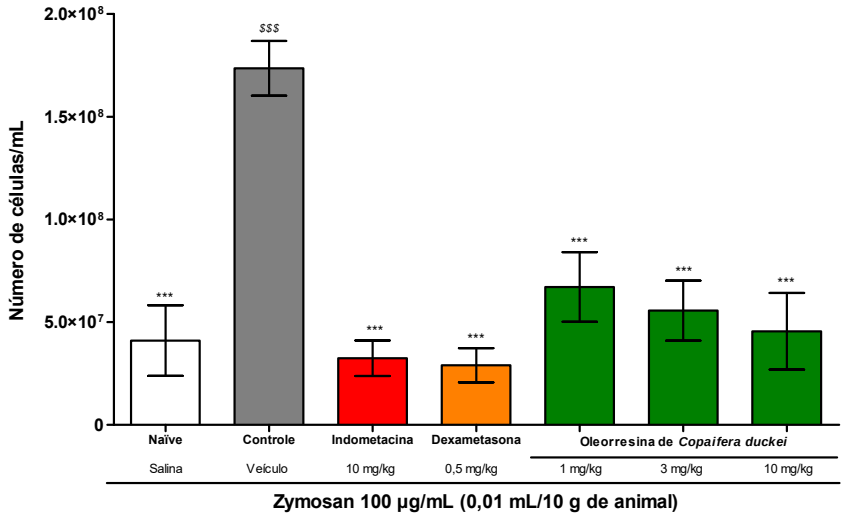


Figura 65. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de C. duckei, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

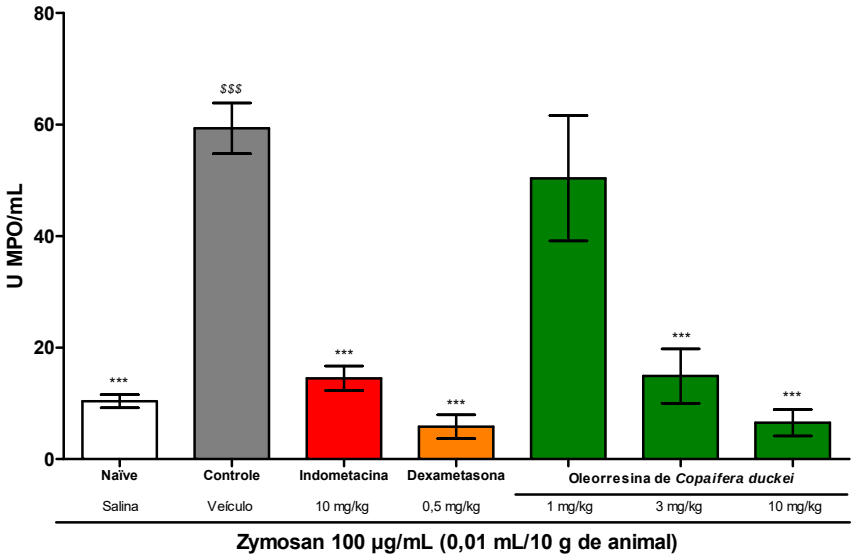


Figura 66. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre obre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

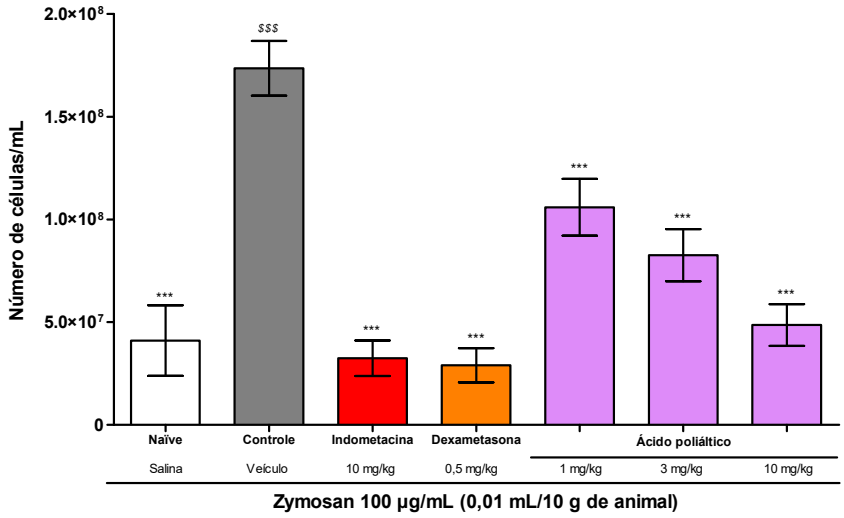


Figura 67. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre o número total de células (leucócitos) no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a posteriori de Tukey.

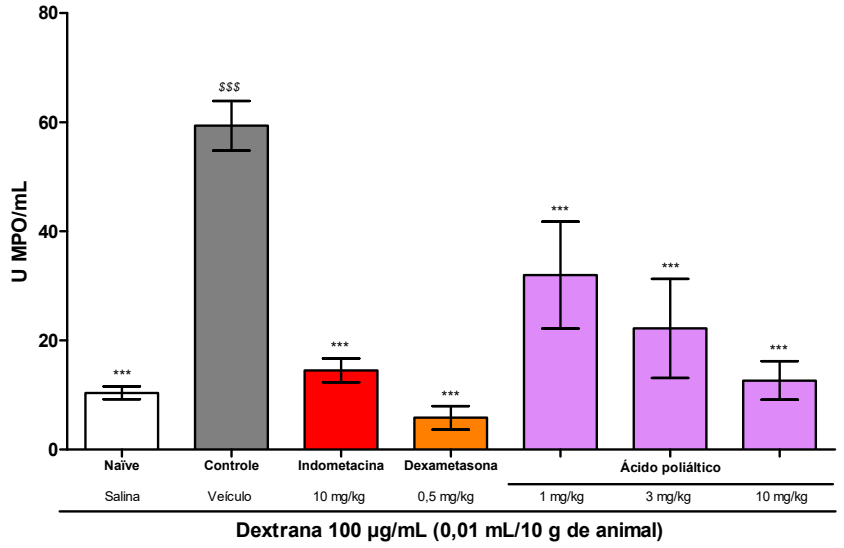


Figura 68. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o. e indometacina na dose de 10 mg/kg, v.o., dexametasona na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a concentração da enzima mieloperoxidase no exudato induzido pela injeção de zymosan 100 µg/kg (1 mL/10 g de animal) coletado na bolsa de ar (air pouch) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste a *posteriori* de Tukey.

Como pode ser observado nos experimentos relacionados com a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico, existem aspectos coincidentes, além de outros que podem sugerir os mecanismos de ação.

As substâncias presentes na oleorresina de *Copaifera duckei*, tais como o ácido possuem propriedades anti-inflamatórios, principalmente por interferirem direta ou indiretamente em mediadores pró-inflamatórios. São estes os metabólitos do ácido aracdônico, peptídios vasoativos e citocina, na produção ou ação de segundos mensageiros, tais como GMPc, AMPc, quinases e cálcio, na ativação de fatores de transcrição tais como o NF-κB, e na expressão de genes pró-inflamatórios envolvidos na síntese de enzimas e citocinas como NOSi, COX-2, IL-1β e TNF-α, neuropeptídios e proteases (BEUKELMAN et al., 2007; CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; CALIXTO et al., 2004; DE BOSSCHER et al., 2005; FÜRST; ZÜNDORF, 2014).

5.6.9 Efeito da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia inflamatória induzida CFA

Com o objetivo de avaliar o efeito terapêutico da olerresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico, os animais foram submetidos à uma injeção prévia de Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant - CFA). O CFA é uma suspensão de micobactéria morta (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*) em óleo de parafina contendo mono-oleato de manitol (BILLIAU; MATTHYS, 2001; STILLS, 2005).

O modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por CFA apresenta características particulares, com início do processo inflamatório rápido e progressão robusta, com inflamação poliarticular e intensa reabsorção óssea (CANNON et al., 1993). Ocorre poliartrite grave, com destruição articular e infiltrado neutrofílico intenso, associado com a produção de vários mediadores inflamatórios e nociceptivos tais como citocinas, neurotrofinas e eicosanoides (SHENKER et al., 2001; TJØLSEN; HOLE, 1997).

A resposta inflamatória e dependente de células T, edema das extremidades, destruição das cartilagens, infiltração de linfócitos, perda de função das articulações e reabsorção óssea, sinais clássicos da artrite reumatoide (BARTON et al., 2007; BENDELE et al., 1999; BILLIAU; MATTHYS, 2001; CAI et al., 2006; KIM; MOUDGIL, 2009). As ações que precedem as alterações articulares são resultado do processo

inflamatório que evolui para poliartrite, com edema e infiltração de linfócitos, células plasmáticas, neutrófilos e macrófagos, e mais tarde com a formação de “giant cell”, massas de aglomerados de macrófagos (OLIVEIRA et al., 2007).

Como consequência, o CFA causa hipernocicepção e alodínia mediadas pela pela sensibilização local do nociceptor e por mecanismos sistêmicos neurais e imunes (SAMAD et al., 2001; WOOLF, 1995). Constitui-se de um modelo experimental que reproduz condições de inflamação crônica extensa e severa, principalmente em articulações (SHENKER et al., 2001; TJØLSEN; HOLE, 1997).

A hipernocicepção mecânica acontece devido a liberação de TNF-α, IL-1β e NGF (WOOLF, 1995; WOOLF et al., 1994), que é uma neutrofina especialmente relacionada à sensibilização neuronal. A inibição do NF-κB resulta na inibição da síntese de mediadores inflamatórios mediados pela COX-2, TNF-α, IL-1β, INF-γ, IL-6, NO produzido pela NOSi, neutrofinas e eicosanoides (CHOU et al., 2011; LIMA et al., 2013).

A alodínia e resultados da sensibilização dos neurônios sensoriais primários de limiar elevado (nociceptores) induzida pela alteração do microambiente químico no local da lesão durante a inflamação, que resulta na alteração do processamento nociceptivo pelas estruturas espinhais e supraespinhais (MILLAN, 1999; MILLAN et al., 1987).

Atua aumentando a expressão de receptores do tipo: TRPV1, sensíveis a temperaturas elevadas e a variações de pH; P2X3, relacionados à dor produzida por ATP; ASIC, associados, juntamente com TRPV1, à dor causada por acidose tecidual; BK, sensíveis às bradicininas, atuando tanto na manutenção da hiperalgesia inflamatória persistente, quanto na amplificação da formação de edema; e canais de Na^+ e K^+, relacionados à despolarização do nociceptor (MENDELL; SAHENK, 2003).

O receptor B1 para cinina exerce papel crucial na manutenção da hipernocicepção inflamatória persistente, enquanto que o B2 parece ter seu maior envolvimento na amplificação do estágio inicial da formação do edema (FERREIRA et al., 2001).

No processo inflamatório, que pode persistir por várias semanas em resposta ao CFA observa-se também aumento da expressão de integrinas do tipo α_4 sobre o endotélio no local da inflamação e de quimiocinas CXCL2 e CXCL1 através da transdução de RNAm, e de moléculas de adesão do tipo P e E selectinas, ICAM-1 e PECAM-1 são expressas por leucócitos. Todas estas são alvos terapêuticos para a

resolução de quadros inflamatórios e dolorosos crônicos, resultando na diminuição da sua expressão no endótelio e em células inflamatórias, ocasionando em uma menor transmigração leucocitária e, consequentemente, em diminuição da liberação de mediadores por células inflamatórias no local da lesão (MACHELSKA et al., 2004).

Após o desenvolvimento do processo inflamatório e hiperalgésico, a administração oral diária da oleorresina de *C. duckei* (**Figura 69**) e o ácido polialtico (**Figura 70**) foram capazes de reduzir a hipernocicepção causada pelo CFA, como indicado pela redução do limiar basal em resposta à estimulação do monofilamento de von Frey (0,6 g) na pata injetada. Esta atividade observada sustenta a hipótese observada nos experimentos anteriores, que de o efeito anti-hiperalgésico atua por vias de sinalização periférica da dor inflamatória, podendo atuar também a nível de SNC, visto que a injeção de CFA resulta um estado de hiperexcitabilidade periférica e central dando origem aos fenômenos conhecidos como hipernocicepção e sensibilização (NAGAKURA et al., 2003).

Além disso, este evento pode ser sustentado pelos resultados obtidos no modelo de *Tail flick.* Ainda, podemos ressaltar que esta atividade não foi perdida com a suspensão do tratamento por 3 dias, principalmente para a dose de 10 mg/kg. Os animais, quando tratados com a droga controle-positivo gabapentina, demonstraram redução significativa e persistente do quadro hipernociceptivo (QUINTÃO et al., 2006)

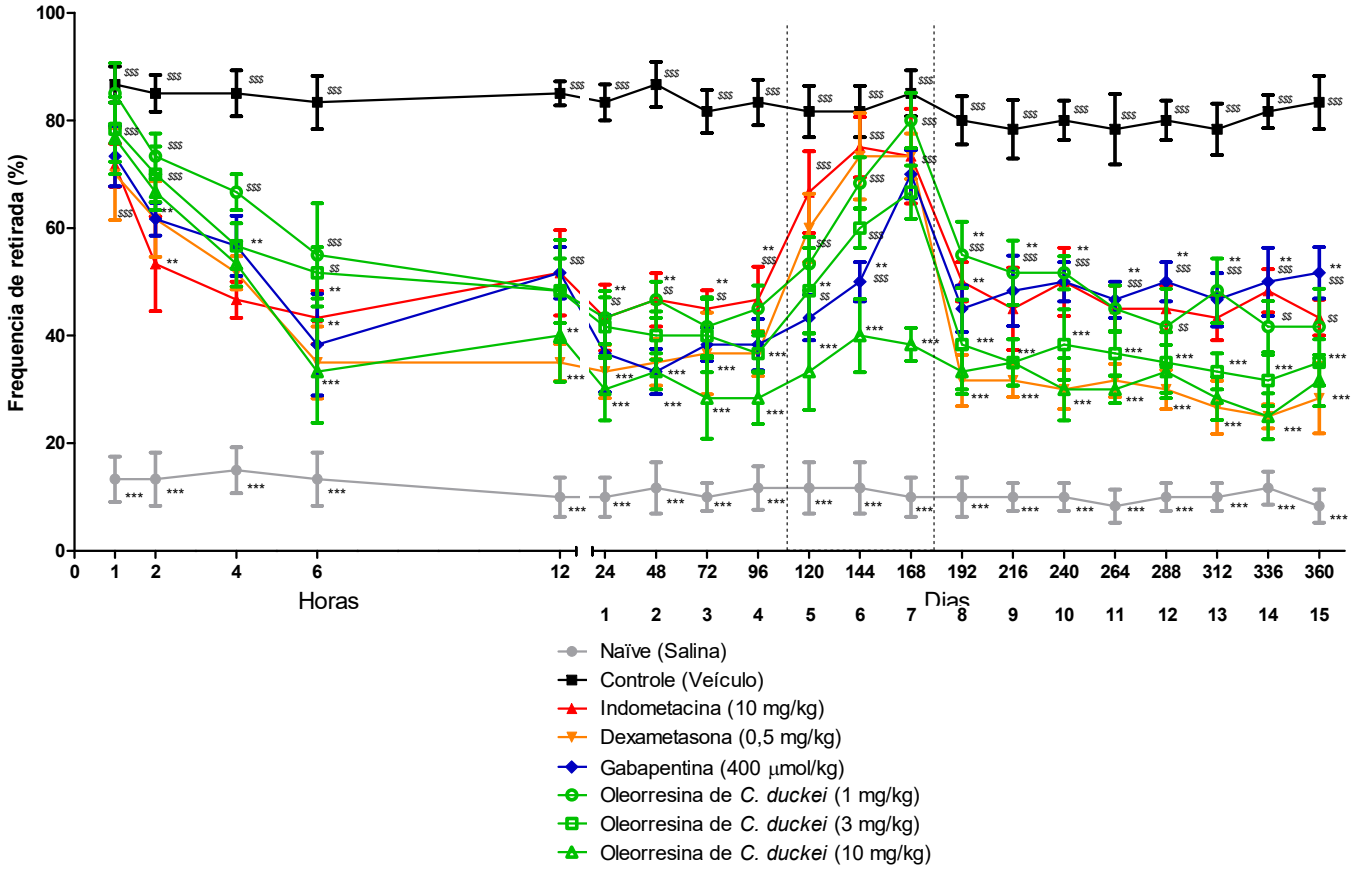


Figura 69. Gráfico do efeito da administração da oleorresina de *C. duckei*, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia inflamatória no teste de von Frey induzida pela injeção de CFA 20μL/pata (1 mg/mL, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

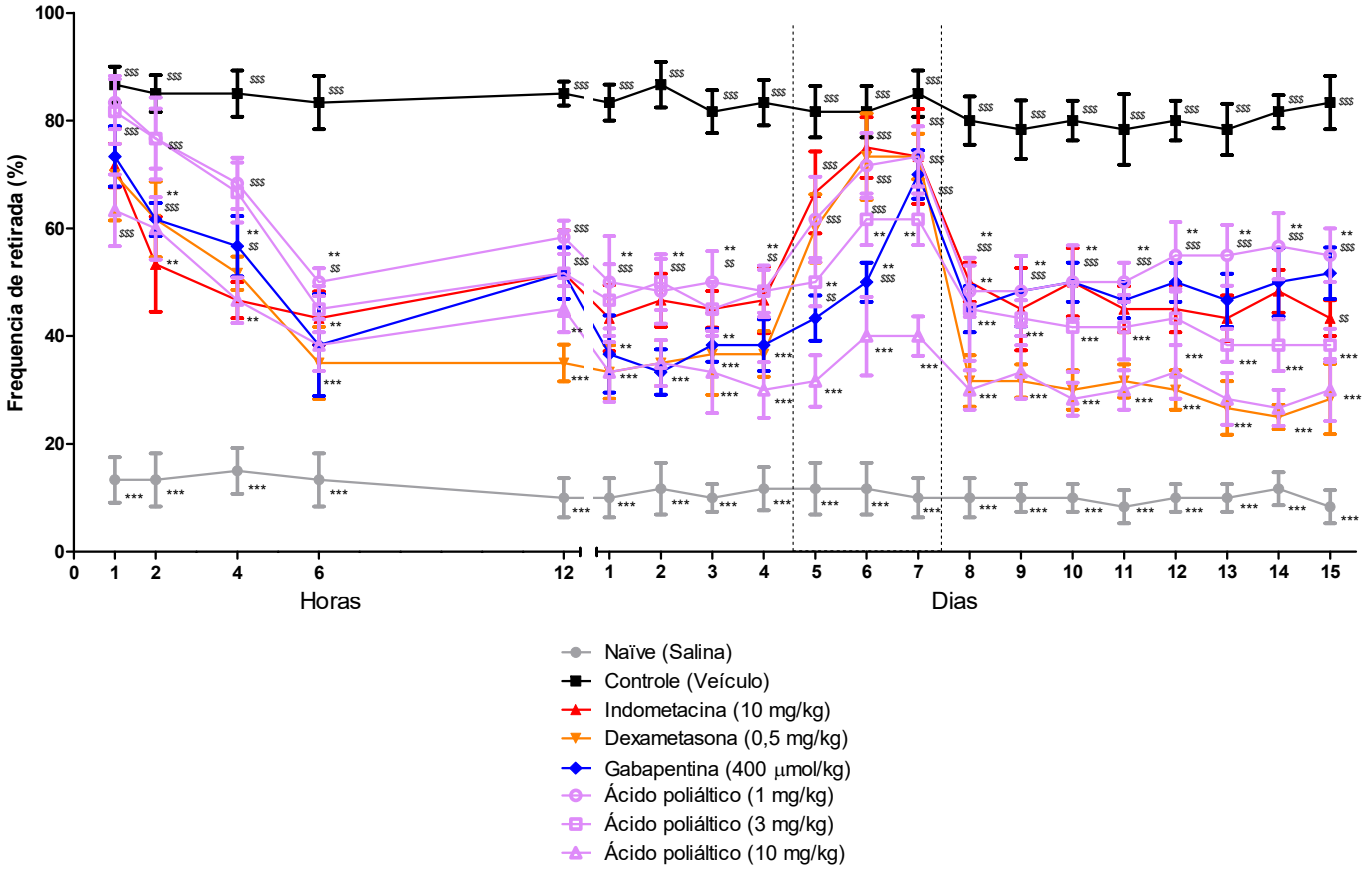


Figura 70. Gráfico do efeito da administração do ácido poliáltico, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, v.o., indometacina, na dose de 10 mg/kg, v.o. dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg, i.p., sobre a hiperalgesia inflamatória no teste de von Frey induzida pela injeção de CFA 20μL/pata (1 mg/mL, i. pl.) em camundongos. Cada linha representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), e ao grupo naïve ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Bonferroni.

5.6.10 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. sobre células THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC® TIB-202®) é derivada do sangue periférico de um ano de idade do sexo masculino com leucemia monocítica aguda. Estas células são pró-monócitos que apresentam diferenciação para monócitos quando estimuladas com LPS, PMA ou DMSO (AUWERX, 1991).

De maneira similar aos resultados encontrados com a linhagem AGS, a linhagem neoplásica de pró-monócito humano (THP-1) também demonstrou maior sensibilidade ao tratamento com a oleorresina, extratos e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. A viabilidade celular pelo método de fosfatase ácida encontra-se diminuída em dose-tempo-dependente (**Tabela 43**), quando comparado ao estudo com linhagens não-neoplásicas descritas anteriormente. A atividade citotóxica foi confirmada através da determinação do percentual de células vivas e mortas por citometria de fluxo marcadas com iodeto de propídio (**Tabela 44**) (PICK et al., 2004). As oleorresinas também apresentam maior potencial citotóxico quando comparadas com a atividade citotóxica apresentada pelo extrato das folhas.

Tabela 43. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de viabilidade celular em linhagem celular THP-1 por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Tempo / Substância		24h	R^2	72h	R^2	120h	R^2
Oleorresina de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	28,14±1,47	0,996	22,84±2,36	0,962	19,93±0,79	0,970
	CC_{50}	51,08±2,10		40,63±5,36		37,51±2,98	
	CC_{80}	80,60±3,71		61,59±10,24		58,68±5,35	
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	CC_{20}	70,90±5,02	0,938	26,09±5,13	0,878	8,911±3,65	0,921
	CC_{50}	874,81±7,84		118,91±14,78		71,57±7,38	
	CC_{80}	10793,14±25,99		574,83±25,05		241,79±13,92	
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	88,91±6,97	0,965	55,30±5,50	0,979	21,30±4,38	0,935
	CC_{50}	121,11±12,78		101,80±5,40		64,31±8,35	
	CC_{80}	194,18±24,55		187,37±18,13		164,98±12,75	
Extrato das folhas de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	89,95±20,17	0,950	42,52±4,69	0,877	5,81±1,60	0,904
	CC_{50}	155,86±26,19		104,87±207,48		39,56±6,22	
	CC_{80}	478,05±11,00		270,06±69,11		169,18±7,90	
β-cariofileno (µM)	CC_{20}	63,66±9,94	0,848	11,50±4,10	0,981	4,91±0,50	0,890
	CC_{50}	192,51±14,87		34,80±7,89		12,03±0,76	
	CC_{80}	309,92±25,40		105,34±14,97		29,44±2,99	
Ácido poliáltico (µM)	CC_{20}	186,36±6,12	0,857	19,70±3,50	0,877	9,35±3,19	0,920
	CC_{50}	226,58±12,92		106,85±11,97		83,52±10,76	
	CC_{80}	605,08±17,33		539,62±18,68		360,39±20,18	
Ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(14)** (µM)	CC_{20}	52,96±9,21	0,854	14,34±1,67	0,943	10,82±1,29	0,963
	CC_{50}	530,82±16,21		376,89±2,97		55,70±4,67	
	CC_{80}	1241,39±24,00		903,13±16,20		286,60±10,38	
Ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil-quínico **(16)** (µM)	CC_{20}	29,32±5,21	0,984	27,36±3,03	0,939	21,81±1,57	0,982
	CC_{50}	954,67±16,53		233,07±12,48		72,56±3,61	
	CC_{80}	3177,49±29,44		1985,40±16,33		241,42±14,66	
Paclitaxel (nM)	CC_{20}	21,74±3,80	0,910	3,70±1,03	0,899	2,37±0,53	0,958
	CC_{50}	128,12±21,30		25,61±4,21		10,59±1,06	
	CC_{80}	754,93±89,61		177,29±56,18		33,19±5,96	
Camptotecina (nM)	CC_{20}	20,57±3,22	0,924	5,67±0,77	0,983	3,06±1,07	0,934
	CC_{50}	67,02±21,69		39,23±8,17		8,90±0,68	
	CC_{80}	112,78±23,08		82,35±18,81		13,98±2,09	
Celecoxib (µM)	CC_{20}	15,38±2,81	0,957	6,91±0,93	0,967	3,72±0,41	0,974
	CC_{50}	35,16±3,68		19,63±1,92		11,58±1,06	
	CC_{80}	80,37±10,13		55,74±8,12		49,27±7,72	
Indometacina (µM)	CC_{20}	12,24±4,05	0,895	7,08±1,65	0,910	1,91±0,29	0,969
	CC_{50}	59,07±13,09		26,13±8,61		7,33±0,62	
	CC_{80}	137,62±32,40		64,86±15,71		28,16±4,16	

Tabela 44. Valores de porcentagem de células vivas e mortas para o branco (sem adição de PI), controle, DMSO 2%, a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e os controles citotóxicos paclitaxel e camptotecina, no teste de determinação de morte celular por iodeto de propídio por citometria de fluxo em linhagem celular THP-1 (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Tempo / Substância		24h		72h		120h	
	Conc.	Células vivas	Células mortas	Células vivas	Células mortas	Células vivas	Células mortas
Branco	-	83,98±3,38	5,48±0,08	57,70±0,14	33,06±4,28	70,55±0,84	24,96±3,26
Controle	-	76,21±5,72	17,14±4,36	68,16±7,22	31,32±6,93	72,29±0,72	31,38±4,82
DMSO 2%	-	78,43±4,85	15,95±3,46	68,09±3,29	29,86±2,95	73,38±2,61	24,09±0,86
Oleorresina de *C. oblongifolia* (µg/mL)	30	75,56±3,52	18,91±1,24	44,96±11,35	52,81±11,32	31,77±6,80	64,52±5,36
	100	76,69±8,04	18,76±5,45	13,96±16,61	82,80±16,97	8,84±10,84	84,47±11,63
Extrato das folhas de *C. oblongifolia* (µg/mL)	30	78,54±7,47	16,16±5,77	59,29±13,42	38,47±13,17	33,86±7,64	62,48±5,12
	100	76,02±7,19	18,23±7,12	51,20±17,20	46,58±17,09	27,17±6,42	69,21±7,28
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	30	73,85±9,81	19,02±6,13	52,52±10,34	44,53±10,10	29,85±8,84	67,14±8,84
	100	75,84±11,58	18,53±8,24	41,67±10,47	54,54±8,92	18,57±5,82	77,61±7,56
Extrato das folhas de *C. duckei* (µg/mL)	30	72,07±16,16	20,65±10,51	50,14±16,29	47,75±15,48	25,53±2,19	71,56±1,93
	100	75,04±9,86	19,68±8,83	38,98±22,13	59,15±21,67	24,78±2,37	72,10±2,58
β-cariofileno (µM)	10	80,27±7,85	13,96±4,93	45,10±15,70	52,80±14,99	34,94±6,97	57,60±10,88
	30	77,62±3,91	16,39±3,09	37,17±14,10	59,96±15,02	19,67±7,85	77,89±6,91
Ácido poliáltico (µM)	10	80,16±6,33	15,14±6,95	52,46±13,58	45,20±13,08	32,26±5,46	64,25±3,52
	30	79,58±5,35	15,68±4,80	47,85±20,00	50,13±19,88	29,69±1,49	67,87±0,98
Ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil)-quínico **(14)** (µM)	10	78,05±8,53	17,95±6,91	41,64±21,66	56,16±21,00	30,73±7,22	61,84±13,17
	30	76,51±8,53	19,20±7,30	35,25±18,54	62,96±18,59	21,90±8,01	75,75±8,83
Ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil-quínico **(16)** (µM)	10	76,66±6,32	18,97±5,42	46,34±18,55	50,67±17,31	30,40±12,96	66,45±13,68
	30	78,72±6,74	16,26±6,71	43,83±19,82	54,30±19,40	24,10±13,12	73,55±13,35
Paclitaxel (nM)	10	78,73±6,95	15,79±3,79	47,89±16,93	50,01±16,92	36,94±6,07	58,75±4,64
	50	79,49±7,76	15,04±6,65	50,9115,84	47,12±15,69	27,47±7,42	69,66±5,37
Camptotecina (nM)	10	77,59±9,52	17,28±7,63	65,36±9,26	32,50±8,36	43,97±14,10	52,30±12,24
	50	78,01±8,29	14,91±4,77	69,67±11,13	28,10±11,19	45,71±10,27	50,11±12,56

Apesar de serem descritas como células tumorais, quando ativadas, as células THP-1 pró-monócitos podem ser diferenciadas em macrófagos (TSUCHIYA et al., 1982). Possuem características semelhantes aos fagócitos mononucleares, incluindo a produção do ânion superóxido, TNF-α, IL-1β, PGE_2, entre outros, permitindo o

estudo de respostas inflamatórias agudas e crônicas. Seu uso é mais vantajoso quando comparado ao uso de macrófagos isolados do peritônio de roedores (células primárias), pois não expressam facilmente a NOSi. Altas concentrações de óxido nítrico podem interferir nas respostas citotóxicas em estudo, além de aumentar as respostas do LPS e INF-γ (KLEGERIS; MCGEER, 2003).

Além disso, a cultura suspensa de THP-1 pode ser mantida por longos períodos de tempo sob condições estáveis, permitindo estudos de toxicidade de longo prazo, estabelecendo correlações e novos métodos em substituição de estudos de atividade tóxica subcrônica, crônica e reprodutiva, além de estudos de carcinogenicidade e genotoxidade (GARCIA et al., 2013).

A apoptose é um processo fisiológico bem regulado, que permite a remoção eficiente das células do tecido lesionado e é desejável nos processos inflamatórios, pois facilita a remodelação vascular e a regeneração. No entanto, quando ocorre apoptose de morte excessiva e inadequada, resulta no aparecimento de patologias ou processos de cronificação, podendo induzir também processos de necrose. Enzimas e fatores envolvidos nessa complexa cascata incluem caspases, citocinas, polimerases, NF-κB, entre outros (WEHINGER et al., 2007).

Caspases podem estar envolvidas com processos inflamatórios e de choque séptico. No estímulo por LPS, as células THP-1 expressam caspases 1, 4 e 5. A caspase 1 ativa o domínio de morte da caspase 9, iniciando a oligomerização induzida por simal. As caspases 4 e 5 podem ter funções na imunidade inata, desencadeando a cascata de coagulação que serve como importante defesa em infecções bacterianas (SHI et al., 2014).

O estudo das atividades citotóxicas de oleorresinas e extratos de *Copaifera* spp. pode ser correlacionado com o estudo da atividade citotóxica. De acordo com dados da literatura, as oleorresinas de *C. multijuga, C. langsdorffi* e *C. duckei* apresentam efeitos mutagênicos e genotóxicos (LIMA et al., 2003a; MAISTRO et al., 2005; MASSON-MEYERS et al., 2013b). O ácido caurenoico, presente na oleorresina e em menor concentração nas folhas possui atividades citotóxicas, genotóxicas, e mutagênicas (CAVALCANTI et al., 2006; COSTA-LOTUFO et al., 2002). Os diterpenos ácido copálico, 3-hidroxicopálico, colavico-15-metil ester, 3-acetoxi-copálico e hardwíckiico não afetam a viabilidade celular na concentração de 20 µmol/L, em células AGP01 (gástrica), HCT-116 (cólon), NIHOVCAR (ovário), SF295 (glioblastoma), MCF7 (mama) e SK MELL28 (melanoma) (VARGAS et al., 2015). As

substâncias presentes na oleorresina parecem induzir a apoptose por modular a atividade de caspases e aumentar o infiltrado leucocitário no tecido tumoral (GREAY; HAMMER, 2011; LIMA et al., 2003; PETIWALA; JOHNSON, 2015; RUSSO et al., 2015).

Com relação aos compostos presentes nos extratos, os compostos fenólicos possuem atividades antineoplásicas ligadas à diminuição de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (COSTA-MACHADO et al., 2015; REMILA et al., 2015; SANCHES et al., 2015).

Como discutido anteriormente, substâncias ou produtos com atividades antioxidantes em combinado com atividades antitumonais, e neste caso possível atividade anti-inflamatória, podem ser extermamente valiosos na terapia antitumoral quando comparados apenas com substâncias citotóxicas, diminuindo assim o aparecimento dos efeitos secundários da quimioterapia (FANTINI et al., 2015; OOI et al., 2011).

5.6.11 Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. sobre a concentração de interferon gamma (INF-γ), interleucina 1-beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e em sistema multi-spot em células THP-1

A tecnologia *multi-spot* (ou *multi-array*) utiliza a técnica eletroquimioluminescência acoplada a microchips, permitindo executar diversas análises biológicas em um curto intervalo de tempo (**Figura 71**). Cada chip, inserido em cada poço das placas permite análises multi-pontuais de vários analitos, tais como citocinas e biomarcadores, em uma única amostra, e com uma única plataforma de dados. Além disso, este sistem utiliza volumes de amostra extremamente baixos (10 a 20 µL), com grande sensibilidade, precisão e exatidão (pg/mL) (MSD, 2004; SOURIAL; MARCUSSON-STÅHL; CEDERBRANT, 2009).

Figura 71. Representação esquemática da placa no sistema *multi-spot*
Fonte: https://www.mesoscale.com/~/media/images/technical%20resources/plate_well_diagram.png?la=en

Foram testadas neste sistema o sobrenadante de células THP-1 tratadas com oleorresina e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* e suas substâncias majoritárias, β-cariofileno, ácido poliáltico, ácido 3,4,5-tri-*O*-galoil quínico [14] e ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil galoil) quínico [12], em duas concentrações e em dois diferentes tempos de exposição ao LPS.

Os interferons são produzidos por monócitos, macrófagos, células linfoblásticas, e fibroblastos. Atualmente existem 23 membros funcionais classificacos como interferons e suas principais ações biológicas são as propagações das infecções virais, parasitoses e células tumorais, além de estimular as defesas de células (BONJARDIM; FERREIRA; KROON, 2009; BORDEN, 1992). Existem três tipos separados com base em tipos de receptores: o interferon tipo II (com subtipos α, β, ε, κ e ω em humanos), o tipo II ou γ (conhecido também como tipo imune) e o tipo III ou λ (interleucina 28/29). A forma alfa do interferon tipo I é produzida por leucócitos e a forma beta por fibroblastos quando invadidos por vírus. Induz a síntese de proteínas que impedem a replicação do vírus, sendo eficiente no tratamento de hepatite B, C (INF-α) e esclerose múltipla (INF-β). Sua produção é estimulada pelas interleucinas 1 e 2 (DE WEERD; SAMARAJIWA; HERTZOG, 2007; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2010; PARKIN; COHEN, 2001).

O interferon tipo II ou γ é secretado por células T *helper* e *natural killer*, especificamente as do tipo 1, sendo ativado pela IL-12 e bloqueando a proliferação de células T *helper* tipo 2, que resulta na indução da resposta imune das células T *helper* tipo 1 e ao desenvolvimento de doenças, tais como a esclerose múltipla. Dependendo do estímulo das citocinas produzidas, as células T *helper* em repouso (Th0) podem se

diferenciar em células T *helper* tipo 1 (Th1) ou 2 (Th2). As células Th1 são responsáveis pela síntese de IL-2, INFγ, IL-12INF-γ, IL1-2, IL-16 e IL-18, responsáveis pelo aumento da resposta inflamatória. As células Th2 produzem IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que atuam na defesa contra parasitas e em processos alérgicos (KIDD, 2003; MAEYER; MAEYER-GUIGNARD, 1992; PARKIN; COHEN, 2001). Já o interferon do tipo III é o descoberto mais recentemente, e atua sobre um complexo receptor diferente dos receptores para tipos I e II. Pouco se sabe a respeito deste interferon e de seu receptor, mas indícios apontam para o envolvimento em infecções virais. O INF-γ é sinérgico ao INF-α e ao INF-β na atividade antiviral e antiparasitária, mas sua principal ação é a atividade imunomoduladora (HERMANT; MICHIELS, 2014; SORGELOOS et al., 2013; VILCEK, 2003).

A oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei*, e suas substâncias isoladas inibem a produção de INF-γ em células THP-1, de maneira dose e tempo dependentes (**Figura 72 A** e **B**). Os níveis de INF-γ destes tratamentos são menores que os níveis de INF-γ de sobrenadante de células tratadas com celecoxib, indometacina ou infliximab. A diminuição dos níveis de INF-γ pode resultar em diminuição da atividade inflamatória, diminuição da proliferação de células tumorais. Entre as principais atividades do INF-γ- são a inibição da proliferação de células que sintetizam a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, diminuição da produção de imunoglobulinas tais como IgG1, IgG4 e IgE e aumento da expressão de genes que expressam MHC I e II. Em monócitos e macrófagos estimula a expressão de receptores de alta afinidade para IgG, além de induzir a síntese de TNF-α (MAEYER; MAEYER-GUIGNARD, 1992).

Sendo assim, substâncias que diminuem a síntese de INF-γ podem estar indiretamente diminuindo a proliferação celular, a síntese de citocínas e imunoglobulinas e diminuindo a expressão de genes MHC (GROOM; JOHNS; OLDFIELD, 2007). A atividade imunomoduladora de substâncias isoladas de *Copaifera* spp. é correlacionada com as atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiparasitárias e antitumorais descritas na literatura (LEANDRO et al., 2012; LIMA et al., 2015, 2003a; SANTOS et al., 2008; VARGAS et al., 2015), podendo ser empregados em patologias que interferem nos níveis de INF-γ, tais como doenças ligadas ao colágeno, artrite reumatoide, diabetes mellitus tipo I, esclerose múltipla, doenças ateroescleróticas e cânceres (carcinomas, leucemias e linfomas) (GOLDSTEIN; LASZLO, 1957; PAOLICELLI; DIRENZO; TROJANO, 2009).

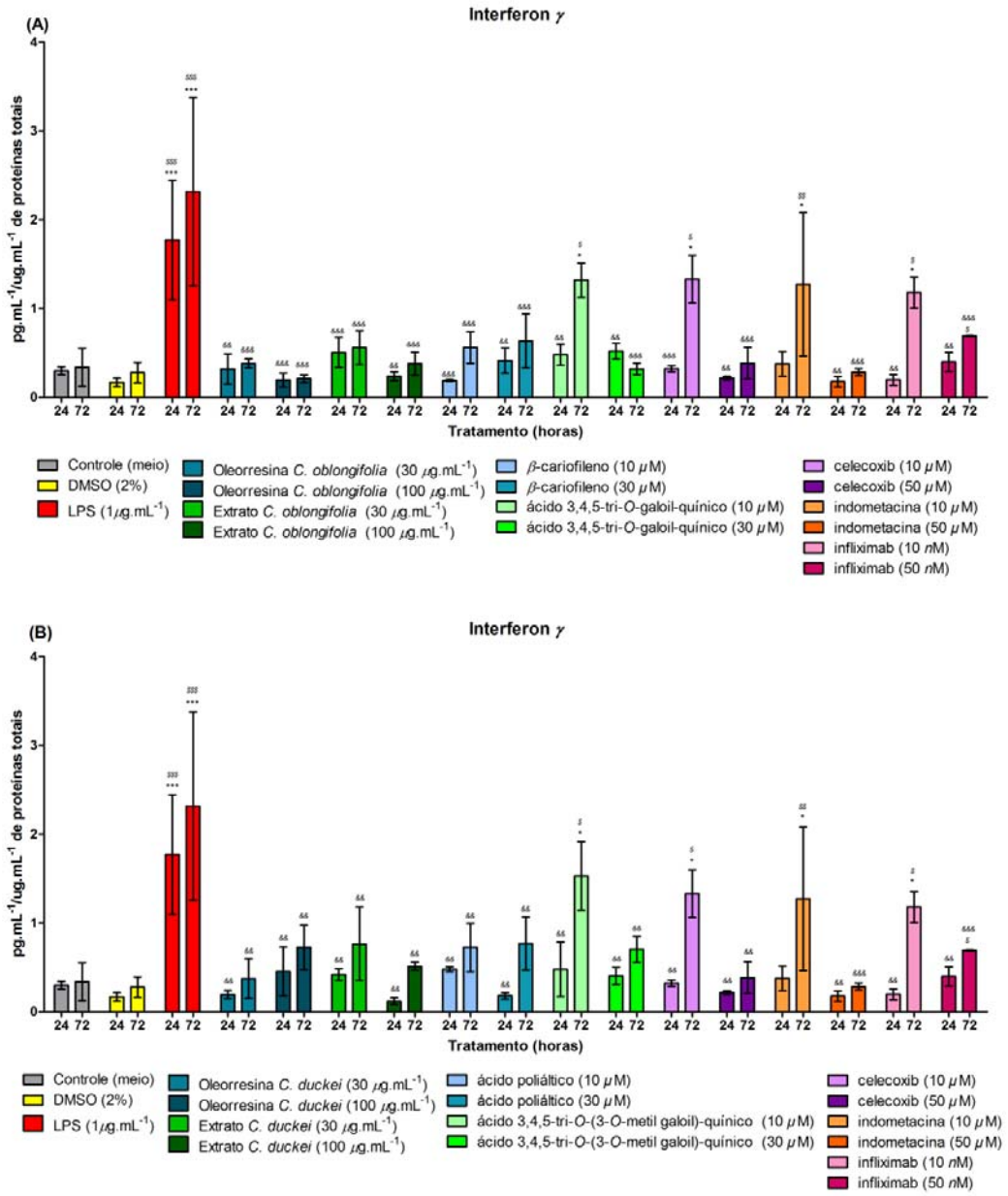


Figura 72. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de INF- γ (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de INF- γ (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

Monócitos e macrófagos são a principal fonte de produção de IL, produzindo principalmente a IL-1β. Queratinócitos produzem em especial IL1α, enquanto que células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos (B e T) produzem todas as formas de IL1 (DINARELLO; WOLFF, 1993; DINARELLO, 1996).

A síntese de IL-1 pode ser induzida por vírus, antígenosm TNF-α e INF. Macrófagos infectados por vírus produzem grandes quantidades de IL-1 (AREND, 1991). As formas α e β possuem atividades homólogas, enquanto que a IL-1 (ou interleucina 18), em conjunto com a IL-12 induz a imunidade mediada por células após a infeção com produtos microbianos, tais como o LPS, para posterior liberação de INF-γ.

As ações da IL-1β podem ser diretas ou indiretas sobre mediadores PGE_2, CSFs, IL-6 e IL-12 Incluem o estímulo de células CD4+, resultando em síntese de IL-2 e expressão de seus receptores, proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos e macrófagos, aumento das atividades quimiotáxicas e fagocitárias, adesão de leucócitos, aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, inibição da proliferação de células endoteliais, aumento da atividade da cascata de coagulação e apoptose (AREND, 1991; DINARELLO, 1996; MONROY et al., 1992). Aumenta a atividade de osteoclastos e adipócitos, sendo prejudicial em pacientes com processo infeccioso crônico, pois resulta em osteoporose e emagrecimento (ROTHWELL, 1991).

Em hepatócitos, o estímulo da IL-1β induz a produção de proteínas de fase aguda de inflamação. Estimula a hematopoese e no hipotálamo atua com pirógeno endógeno, originando um feedback negativo na hipófise, através da liberação de CRH e ACTH, resultando em aumento da produção de corticoesteroides pela córtex da suparenal (MONROY et al., 1992; ROTHWELL, 1991).

Os níveis de IL-1β encontram-se diminuídos com o tratamento das oleorresinas, extratos e substâncias isoladas de *Copaifera* spp. (**Figura 73 A** e **B**). Como a IL-1β atua como citocina pró-inflamatória, a diminuição dos seus níveis resulta em diminuição de todos os eventos relacionados à inflamação mediada por IL-1β, tais como a atividade anti-inflamatória tanto agudas quanto crônicas, em processos ligados às doenças autoimunes, hiperalgesia e canceres (DINARELLO, 2011).

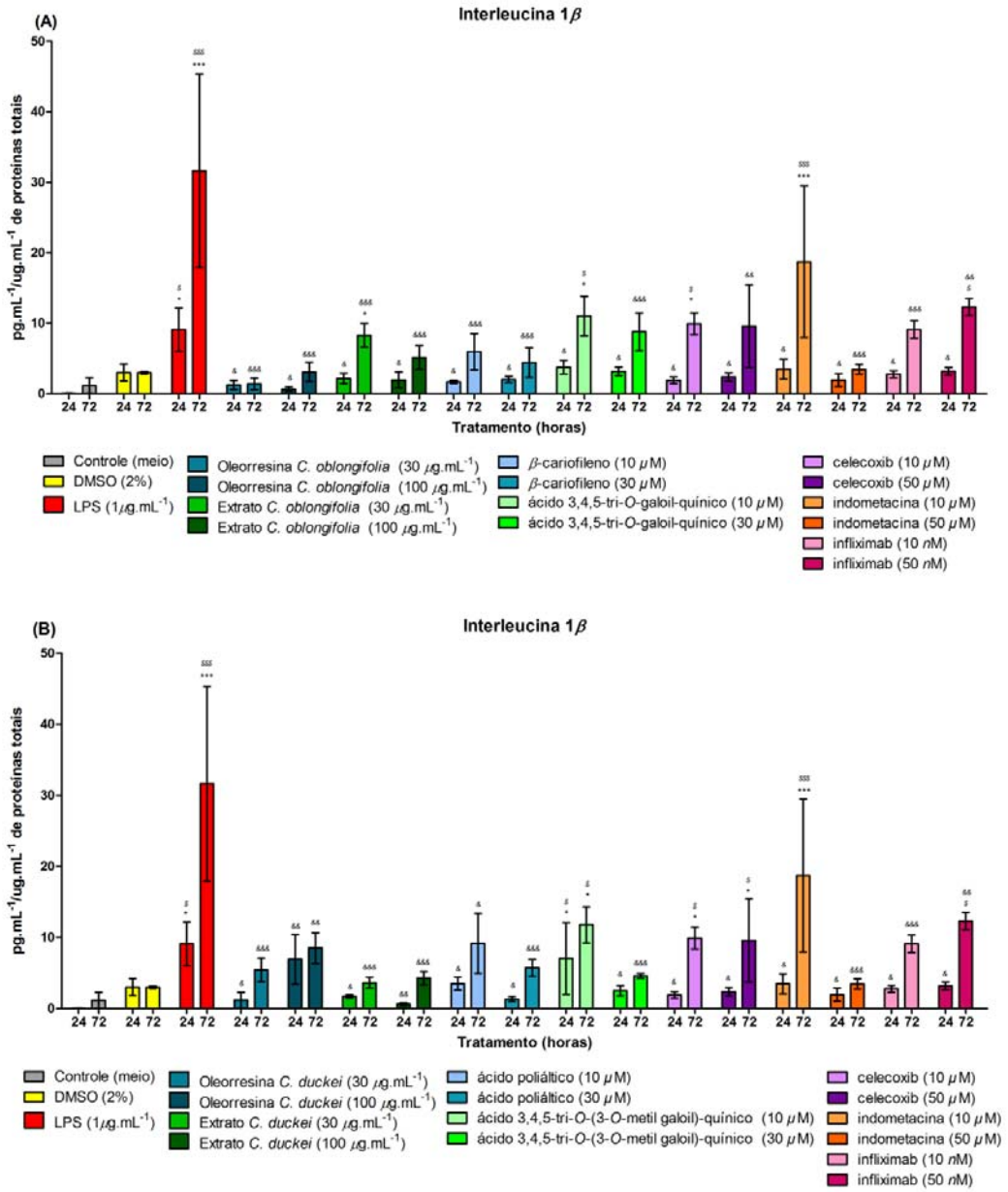


Figura 73. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-1β (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-1β (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

Os monócitos e linfócitos B e T são as principais células que produzem IL-6 em resposta a estímulos de IL-1, TNF e LPS. Influencia respostas imunes específicas e reações inflamatórias de fase aguda, sendo um dos seus principais mediadores. Apresenta importante quimotaxia de eosinófilos para o local inflamado (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990).

Deste modo, existe um grande interesse em desenvolver substâncias que possam inibir a atividade da IL-6. Os tratamentos com oleorresina, extratos e substâncias de *C. oblongifolia* e *C.* duckei alteram os níveis de IL-6 (**Figura 74 A** e **B**). Como seus níveis influenciam os níveis de IL-1β e TNF-α, estes também se encontram diminuídos com os tratamentos acima citados.

O papel da IL-6 como uma citocina anti-inflamatória é mediada através dos seus efeitos inibitórios sobre o TNF-α e IL-1, e a ativação de IL-10. Estimula os processos inflamatórios e autoimunes em muitas doenças, tais como diabetes, aterosclerose, depressão, Alzheimer, lúpus eritematoso sistémico, mieloma múltiplo, cancêr da próstata e a artrite reumatoide (DOWLATI et al., 2010; KRISTIANSEN; MANDRUP-POULSEN, 2005; SMITH et al., 2001; TACKEY; LIPSKY; ILLEI, 2004).

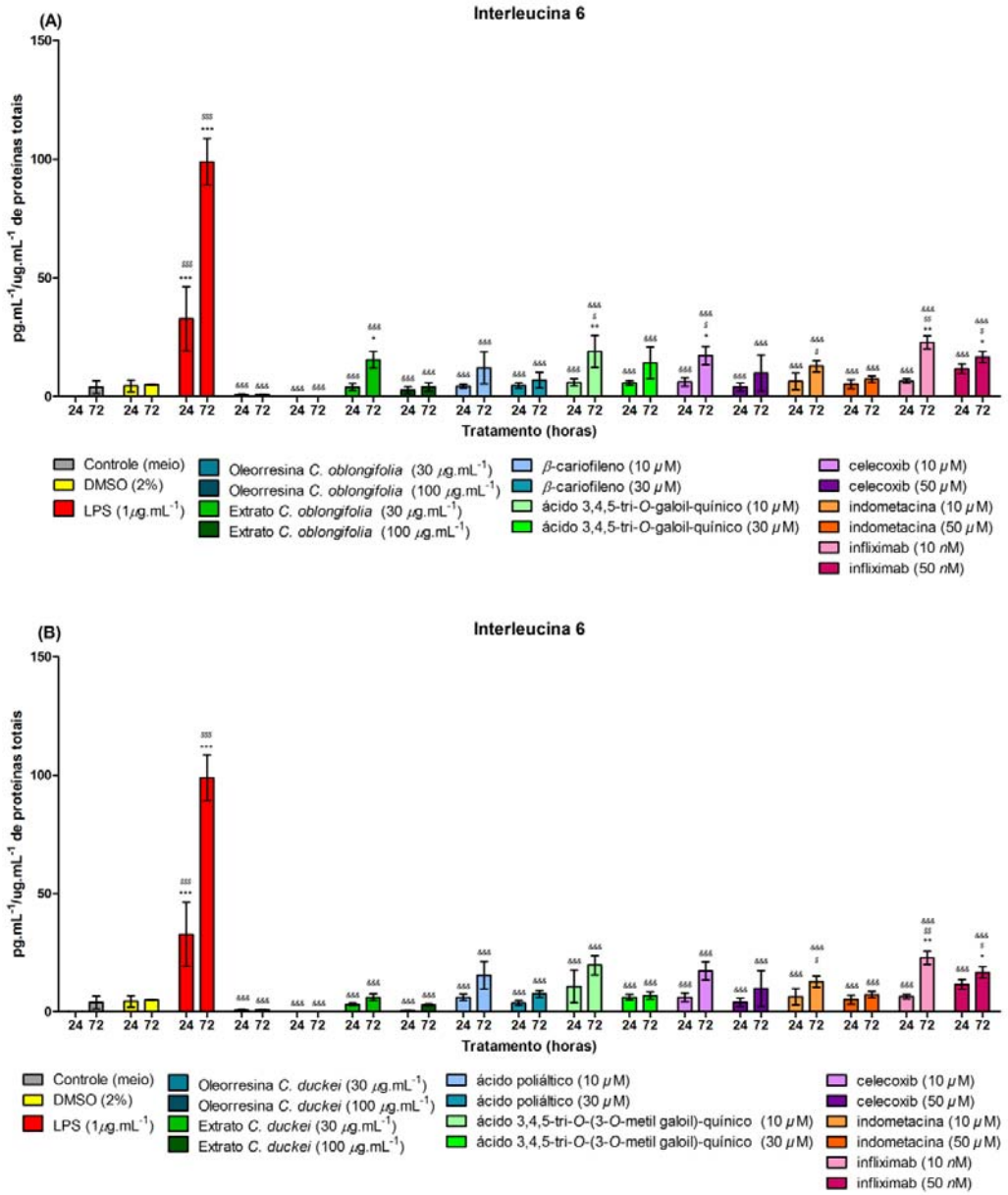


Figura 74. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-6 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-6 (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

A IL-10 é uma citocina pró-inflamatória com múltiplos efeitos no processo inflamatório e na imunorregulação. Atua sobre as células Th1, antígenos do MHC e moléculas co-estimulatórias de macrófagos. Aumenta a sobrevivência de células B, proliferação e produção de macrófagos. Atua bloqueando a atividade do NF-κB (GONZALEZ et al., 2009; SHOUVAL et al., 2014). É produzida principalmente em células CD8+ ativadas, mas pode ser produzida por células T ativadas, linfócitos B, macrófagos ativados e monócitos. Sua síntese é inibida pela IL-4, com mecanismos autorreguláveis (PIERSON; LISTON, 2010; SCHULTE et al., 2011)

Seu principal efeito é inibir a secreção de outras citocinas, tais como INF-γ, IL-2, IL-12 e TNF-β. Atua como coestimulador de proliferação de mastócitos. Ainda é coestimulador no crescimento de timócitos imaturos, agindo como fator de diferenciação para células T citotóxicas (BENJAMIN; KNOBLOCH; DAYTON, 1992; THOMPSON-SNIPES et al., 1991).

Os resultados apresentados na **Figura 75A** e **75B** demonstram que as oleorresinas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* e suas substâncias majoritárias inibem a liberação da IL-10. Os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* não inibem a liberação da IL-10. Os ácidos galoilquínicos isolados do extrato possuem fraca atividade inibidora. A IL-10 induz a formação da COX-2, e a diminuição dos níveis de IL-10 resulta indiretamente na diminuição da inflamação mediada por COX-2. Porém, estudos demonstram que esta inibição COX resulta em ativação da via do tromboxano, resultando em disfunções endoteliais vasculares, cardíacas e renais, um efeito clássico dos anti-inflamatórios seletivos da COX-2 (SIKKA et al., 2013).

Estudos demonstram que existe substancial eficácia no tratamento de tumores pelo aumento de IL-10. O aumento dos níveis de IL-10 resulta em aumento das células CD8+ ativadas, as quais expressam marcadores de ativação para a morte programada (apoptose) e gene de ativação de linfócitos (ALAS; EMMANOUILIDES; BONAVIDA, 2001; PIERSON; LISTON, 2010). Em indivíduos com esclerose múltipla foram observados baixos níveis de IL-10 quando comparados aos indivíduos saudáveis (OZENCI et al., 1999). Os baixos níveis de IL-10 induzem níveis não regulados de TNF-α, por falta da conversão da enzima adequada para a degradação do TNF-α, que é regulada pela IL-10 (BRENNAN et al., 2008). De maneira geral, a manutenção dos níveis de IL-10 próximos a normalidade pode resultar em respostas anti-inflamatórias, resultado da regulação de IL-10 sobre outras citocinas e mediadores envolvidos no processo (NAKAHARA et al., 2012).

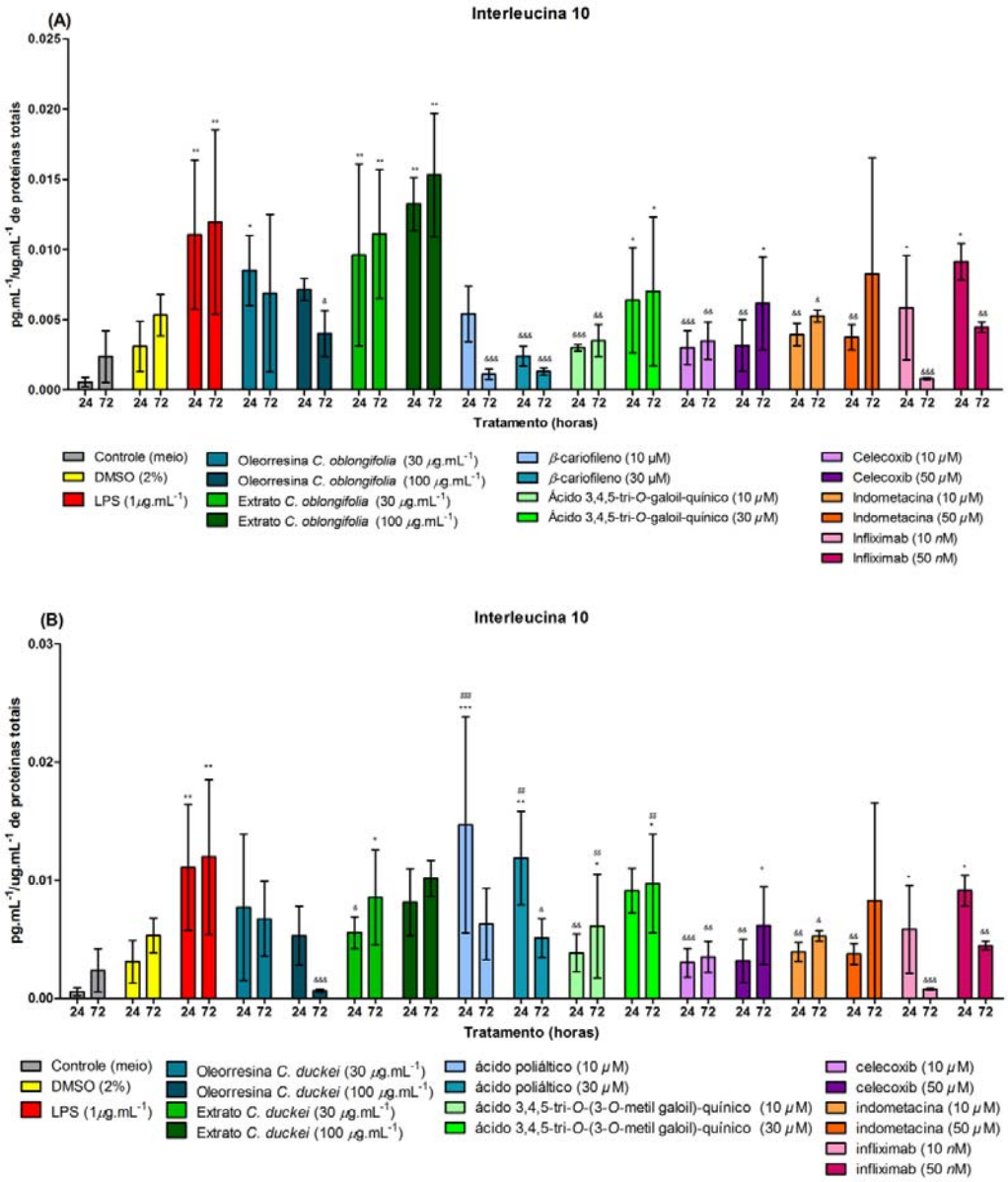


Figura 75. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-10 (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de IL-10 (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

O fator de necrose tumoral ou TNF é sintetizado principalmente por macrófagos, mas também por monócitos, neutrófilos, células T e NK após estímulo por LPS. É uma citocina de sinalização celular que participa manutenção sistêmica da inflamação e é uma das citocinas que compõem a reação de fase aguda (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001b). Diversas sustâncias envolvidas no processo inflamatório estimulam a produção de TNF, tais como INF, IL-1, IL-2, substância P, imunocomplexos, inibidores da COX e PAF. A ciclosporina, os glicocorticoides, a PGE_2, a IL-6 e antagonistas do PAF inibem a sua produção. O TNF-α e o TNF-β atuam sobre o mesmo receptor, porém após endocitose do complexo, suas atividades são distintas (TAYLOR; PETERSON; BASBAUM, 1995; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). A inibição do TNF-α pode ser útil no tratamento de patologias inflamatórias agudas e crônicas, tais como Alzheimer, psoríase e doença inflamatória do intestino, e no tratamento de neoplasias (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001b; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003).

A principal ação do TNF é o aumento da citólise e citoestase em diferentes linhagens celulares, possuindo maior importância sobre células neoplásicas (GAUR; AGGARWAL, 2003), além de ações são semelhantes a da IL-1 (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001b). Possui ação regulatória do sistema imunológico, promove alterações endoteliais com perda da função, diminuição da coagulação, aumento da atividade quimiotáxica e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos. Induz a apoptose e inibe a tumorogênese, além da replicação viral. Também atua como pirógeno endógeno, aumentando a reabsorção óssea, a atividade dos adipócitos e aumenta a expressão de MHC. Altas concentrações de TNF no sangue estão correlacionados com choque séptico (KUNKEL et al., 1991).

Os resultados apresentados na **Figura 76A** e **76B** demonstram que as oleorresinas e extratos de *C. oblongifolia* e *C. duckei* e suas substâncias majoritárias inibem a liberação de TNF-α. Assim, a oleorresina, extrato de folhas e substâncias isoladas de *Copaifera* tornam-se promissoras no tratamento de doenças inflamatórias e na terapia antitumoral, confirmando os resultados obtidos para os ensaios de atividade anti-inflamatória e gastroprotetora (BRAGA et al., 1998; GOMES et al., 2010; VARGAS et al., 2015; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007) e citotóxicas deste estudo (CAVALCANTI et al., 2006; COSTA-LOTUFO et al., 2002; LIMA et al., 2003a; MAISTRO et al., 2005; MASSON-MEYERS et al., 2013b; VARGAS et al., 2015).

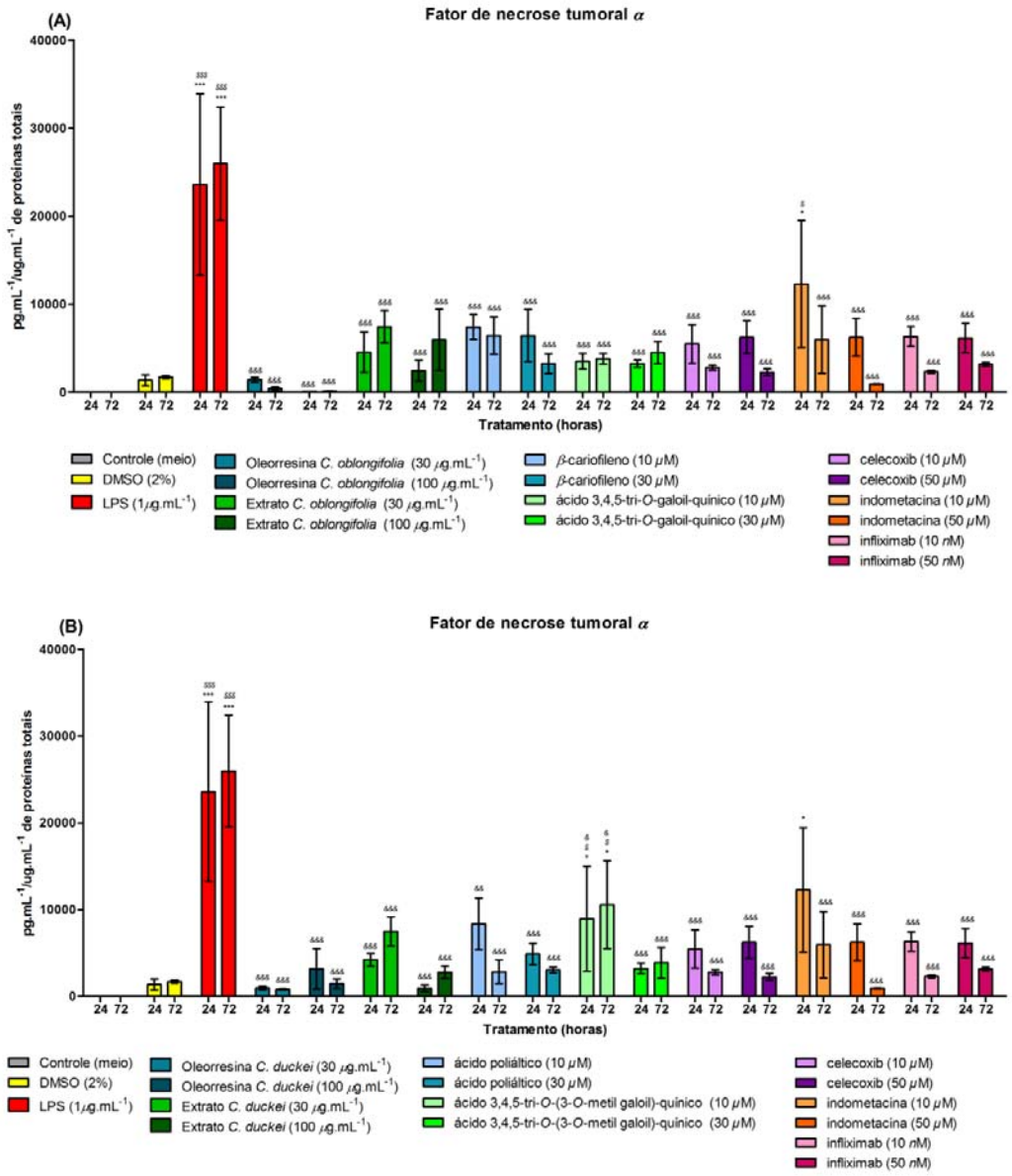


Figura 76. (A) Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. oblongifolia*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, β-cariofileno e ácido 3,4,5-tri-O-galoil quínico [14], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de TNF-α (pg/mL por ug/mL de proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. **(B)** Gráfico do efeito de oleorresina e extrato das folhas de *C. duckei*, na concentração de 30 e 100 µg/mL, ácido poliáltico e ácido 3,4,5-tri-O-(3-O-metil galoil) quínico [12], nas concentrações de 10 e 30 µM, e os controles celecoxib e indometacina, nas concentrações de 10 e 50 µM, e infliximab, nas concentrações de 10 e 50 nM sobre os níveis de TNF-α (pg/mL por ug/mLde proteínas totais) em linhagem celular THP-1 estimuladas por LPS (1 µg/mL) determinadas pelo método de *multi-spot*. Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ao grupo controle do solvente (DMSO 2%) ($p<0,05, $$p<0,01 e $$$p<0,001) e grupo LPS (&p<0,05, &&p<0,01 e &&&p<0,001). Dados normalizados pela transformação de Box-Cox, ANOVA, teste a posteriori de Bonferroni.

5.6.12 Efeitos da oleorresina de *C. duckei* e do ácido poliáltico sobre atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc

No estudo da citologia, os macrófagos são células com grandes, estando presentes no tecido conjuntivo. São responsáveis pelas defesas do organismo contra infeções e ativos no processo de involução fisiológica de alguns órgãos, como por exemplo o útero após o parto. Possuem lisossomos e são responsáveis pela fagocitose de elementos estranhos ao corpo, tais como restos celulares, partículas inertes ou microrganismos (BECK, 2009; MUNKER et al., 2007).

Os macrófagos derivam dos monócitos do sangue e de células conjuntivas ou endoteliais. Além disso, os macrófagos têm a capacidade de expor em suas superfícies fragmentos de moléculas derivadas de sua ação fagocitária, apresentando estes fragmentos para células do sistema imunitário (linfócitos T e B) que podem iniciar uma resposta imune após o reconhecimento destes fragmentos. Exercendo esta função os macrófagos recebem também o nome de células apresentadoras de antígenos (APC – *Antigen Presenting Cells*). Expressam um grande número de receptores, tais como para citocinas pró-inflamatórias, moléculas de reconhecimento, proteínas do sistema complemento, imunoglobulinas e moléculas de adesão (BYRD-LEIFER et al., 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SHOUVAL et al., 2014; SUDSAI et al., 2013).

Os monócitos, conhecidos como macrófago RAW 264.7, são derivados de leucemia de Abelson induzida por vírus em camundongos *Balb/C*. Esta linhagem célular possui características normais de macrófagos, sendo amplamente utilizada em estudos *in vitro* para a investigação de atividades anti-inflamatórias. Recentemente, estas células foram geneticamente modificadas com uma integração estável de um gene repórter de NF-κB, que resulta na liberação de luciferase. A concentração de luciferase é proporcional a quantidade de NF-κB no sobrenadante e interior de células expostas a estímulos, tais como lipopolissacarídeo (LPS) ou peptídeoglicano (PGN) (DEY et al., 2015; RASCHKE et al., 1978).

Nesta etapa do estudo, investigou-se a ação da oleorresina de *C. duckei* sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7-Luc a fim de se identificar um possível efeito tóxico sobre essas células *in vitro* e dar seguimento ao estudo de mecanismo de ação.

A viabilidade celular pelo método da fosfatase ácida encontra-se diminuída em dose-tempo-dependente, porém as concentrações testadas apresentaram-se ideais para o seguimento do estudo (**Tabela 45**).

Tabela 45. Valores de concentração citototóxica 20% (CC_{20}), 50% (CC_{50}) e 80% (CC_{80}) para a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico, no teste de viabilidade celular em linhagem celular RAW-264.7-Luc por fosfatase ácida (os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas).

Substância \ Tempo		24h		72h	
			R^2		R^2
Oleorresina de *C. duckei* (µg/mL)	CC_{20}	146.25±5.81	0,967	38.56±9.74	0,962
	CC_{50}	231.45±9.24		133.45±6.93	
	CC_{80}	461.83±5.64		183.98±4.62	
Ácido poliáltico (µM)	CC_{20}	85.56±2.42	0,987	60.09±4.43	0,930
	CC_{50}	123.04±7.27		93.23±8.64	
	CC_{80}	395.38±6.34		211.79±7.12	

Descrito pela primeira vez em 1986, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) é um heterodímero que pertence à família de fatores de transcrição presente em quase todos os tipos de células animais (HOEFLICH et al., 2000; SEN; BALTIMORE, 1986; VIATOUR et al., 2005). É ativado por diversos estímulos, tais como neurotransmissores (como por exemplo glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a β-amiloide), citocinas (IL-1 e TNF), glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a COX-2, quimioterápicos (tais como paclitaxel), entre outros (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; LUQMAN; PEZZUTO, 2010; MERCURIO; MANNING, 1999). Independente do estímulo, para que haja a ativação da via do NF-kB, parece que a participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular estão correlacionados. Fisiologicamente está relacionado com a imunidade, inflamação, proliferação celular, apoptose e desenvolvimento embrionário (JANSSENS; TSCHOPP, 2006).

Em mamíferos, pertence a uma família de proteínas composta por 5 membros: p65 (ou RelA), RelB, Rel (ou c-Rel), NF-κB1 (p50 e seu precursor p105) e NF-κB2 (p52 e seu precursor p100). Todos os membros dessa família de fatores de transcrição são caracterizados pela presença de um longo trecho N-terminal de 300 aminoácidos,

denominado domínio homólogo Rel (RHD) (JANSSENS; TSCHOPP, 2006), que é responsável pela ligação ao DNA, interação com proteínas inibidoras kB (IkBs), translocação para o núcleo e dimerização (GHOSH; KARIN, 2002).

Quando não estimulado, o NF-κB está principalmente localizado no citoplasma associado à proteína IκB (proteína inibitória kappa B) (GHOSH; BALTIMORE, 1990). A interação NF-κB/IκBs torna o NF-κB inativo, pois mascara o sinal de localização nuclear (JANSSENS; TSCHOPP, 2006).

Essa associação impede a exposição das sequências de sinal de localização nuclear (NLS) localizadas no NF-κB, bloqueando a sua migração para o núcleo. Quando a célula recebe um estímulo que ative a via de sinalização do NF-κB, ocorre fosforilação da proteína IkB o que induz a sua ubiquitinação e seguinte degradação pelo proteassoma 26S. Dessa maneira, as NLS do NF-κB ficam expostas e o fator de transcrição migra para o núcleo, onde induz a expressão de genes específicos (GHOSH; KARIN, 2002; RICE; ERNST, 1993).

Uma vez ativado por agentes como o LPS, este fator possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κB). A ativação do NF-κB ocorre por duas vias distintas: a via canônica e a via não-canônica. A via canônica é a clássica e é ativada por vários fatores como, por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias. A via não canônica é a via que regula o processamento da p100 e pode ser ativada por citocinas como o fator ativador de células B (BAFF), linfotoxina α (LTα) e CD40. Esta via de sinalização ativa a quinase indutora de NF-κB (SRIVASTAVA; RAMANA, 2009; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

No núcleo, o NF-κB pode induzir a expressão de mais de 200 genes, entre eles os que interferem na supressão da apoptose, indução da transformação celular, proliferação, invasão, metástase, resistência a quimioterápicos e inflamação. Desta forma, substâncias que atuem sobre a via do NF-κB, principalmente inibindo sua ativação são alvos terapêuticos promissores (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; LUQMAN; PEZZUTO, 2010)

Nos processos inflamatórios a implicação do NF-κB como alvo terapêutico implica na transcrição de genes ligados a plasticidade, morte e defesa, tais como na produção de enzimas, como a NOSi e a COX-2, e de defesa antioxidante SOD, interleucinas, TNF-α, moléculas de superfície celular, como a molécula 1 de adesão de célula vascular, molécula 1 de adesão de célula intracelular, E-selectina,

complexos de histocompatibilidade de classe I e II (MHC1 e MHC2), proteínas de fase aguda, como a amiloide série A (LI; LIN, 2008; VIATOUR et al., 2005).

Através da **Figura 77** e **78** podemos confirmar que a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico apresentam interferência na via do NF-κB, através da possível interação com receptores Toll-4 (LPS) e Toll-2 (PGN).

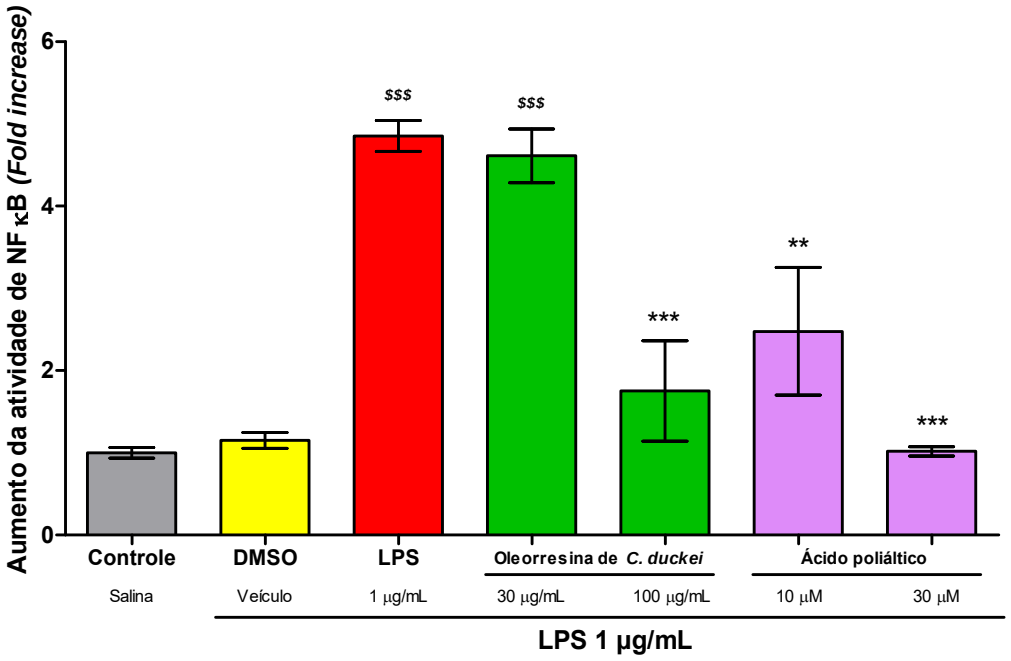


Figura 77. Gráfico do efeito do tratamento com a oleorresina de *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL e do ácido poliáltico nas concentrações de 10 e 30 µM no teste atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc induzido por LPS 1 µg/mL (ensaio da luciferase. Os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Tukey.

Estudos demonstram que os receptores TLRs ativam a via de NF-kB, regulando a expressão de citocinas, através de várias moléculas. A ativação da via do NF-kB conduz a iniciação da resposta adaptativa imune pela produção de citocinas inflamatórias tais como a IL-1, IL-8, fator de necrose tumoral-alfa, IL-12, e a indução de moléculas de co-estimulação, tais como a CD80, CD86 e CD40 (JESIC et al., 2014).

Os terpenos, classe a qual pertencem os principais constituintes a oleorresina das *Copaifera* spp., representam o grupo mais diversificado de metabólitos secundários, e também possuem uma extensa lista de atividades farmacológicas atribuídas, dentro elas a capacidade de interferir na via do NF-κB, tornando-se assim,

potenciais moléculas no desenvolvimentos de fármacos que envolvam distúrbios inflamatórios, tais como câncer ou Alzheimer (BELLEZZA et al., 2013; CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; CALIXTO et al., 2004; LUQMAN; PEZZUTO, 2010; SALMINEN et al., 2008; SCHMIDT et al., 2009; TRAVÉS et al., 2014).

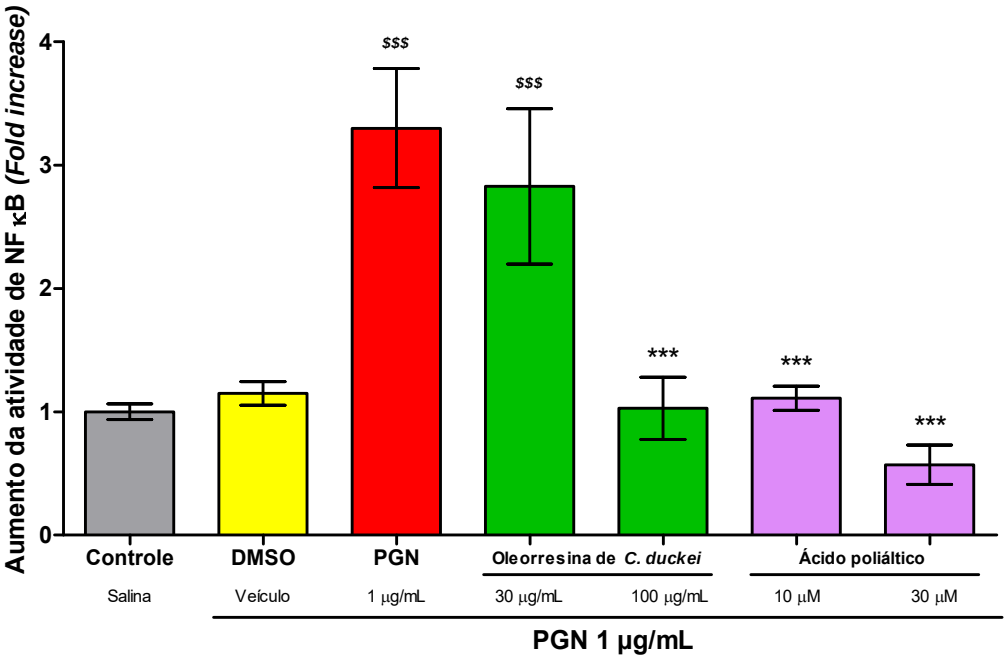


Figura 78. Gráfico do efeito do tratamento com a oleoresina de *C. duckei*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL e do ácido poliáltico nas concentrações de 10 e 30 µM no teste atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc induzido por PGN 1 µg/mL (ensaio da luciferase. Os resultados são expressos em média±EPM; n=3, por replicata, com 3 replicatas). Cada barra representa a média com E.P.M. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001), ANOVA, teste *a posteriori* de Tukey.

Os resultados obtidos neste estudo são corroborados pelos resultados de outros estudos publicados na literatura, nos quais podemos encontrar que as substâncias presentes nas oleorresinas de *Copaifera* spp. apresentam atividade anti-inflamatória, provavelmente por atuar em receptores ligados a ativação da via do NF-κB, tais como os receptores Toll, e assim diminuindo as concentrações de algumas citocinas, como INF-γ, IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α, reforçando assim os resultados encontrados nos ensaios com as células THP-1, em *multi-spot* (*multiplex*).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se concluir que:

1. Através das análises de CG-MS e UHPLC-(ESI)-HRMS foi possível confirmar que as oleorresinas de espécies de *Copaiferas* spp. são constituídas majoritariamente de terpenos, mais precisamente uma mistura de diterpenos e sesquiterpenos. O ácido *ent*-poliáltico é a substância majoritária presente na oleorresina de *C. duckei.*

2. O extrato das folhas de *Copaiferas* spp. é composto de substâncias de média a alta polaridades, tais como flavonoides e derivados galoilquínicos, possuindo grande complexidade. A análise por desreplicação sugere a presença de epicatequinas nas folhas.

3. A oleorresina, extrato das folhas e substâncias isoladas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* apresentam pouca atividade citotóxica em linhagens celulares imortalizadas CHO-k1 e L929 nos tempos de 24 e 72 horas, sendo a atividade mais pronunciada em 120 horas;

4. O extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* é seguro até a dose de 2000 mg/kg. A administração da oleorresina promove alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas. A oleorresina de *C. duckei* é tóxica na dose de 2000 mg/kg no ensaio de toxicologia aguda com dose única em 14 dias.

5. Os animais toleram o tratamento com oleorresina de *C. duckei* é nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg no ensaio de toxicologia subcrônica com doses repetidas durante 90 dias, sendo observadas discretas alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas.

6. A oleorresina, extratos das folhas, e suas substâncias isoladas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* apresentam atividade citotóxica em linhagem celular

imortalizada AGS, sendo confirmada através da determinação da porcentagem de células mortas por citometria de fluxo, demonstrando potencial para o tratamento de distúrbios gástricos associados à câncer gástrico e maior seletividade para células neoplásicas;

7. A oleorresina e extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* promoveram um aumento da proliferação celular de células L929 *in vitro*, sugerindo que há estímulo do mecanismos de reparo, favoráveis aos processos de cicatrização.

8. As oleorresinas e os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* promovem efeitos citoproterores sobre a mucosa gástrica nos modelos de úlceras agudas induzidas por EtOH/HCl e AINEs.

9. As frações diclorometânica e acetato de etila do extrato das folhas de ambas as espécies de *Copaifera* spp. contêm os compostos responsáveis pela citoproteção gástrica.

10. Ao que os resultados indicam, os terpenos β-cariofileno, óxido de cariofileno e α-humuleno, o flavonoide afzelina e os derivados galoilquínicos ácido 4-*O*-(galoil 3-*O*-metil)-5-*O*-(galoil)-quínico (**11**), ácido 4-*O*-(galoil)-5-*O*-(galoil 3-*O*-metil)-quínico (**12**) e o ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico (**13**) são as substâncias responsáveis pela manutenção da integridade tecidual no modelo de úlceras induzidas por EtOH/HCl.

11. Tanto a oleorresina quanto o extrato das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* apresentam atividade cicatrizante gástrica no modelo de úlceras induzidas por ácido acético, confirmando a atividade cicatrizante, resultando em cicatrização da úlcera, sendo observada macro e microscopicamente.

12. A oleorresina de *C. oblongifolia* e *C. duckei* não contribui para o aumento do pH estomacal, mas diminui a quantidade de íons H^+ secretado. Os extratos

das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* aumentam significativamente a quantidade de muco, favorecendo os mecanismos de defesas gástricas.

13. A oleorresina e o extrato das folhas de *C. oblongifolia* são ativos contra a bactéria *H. pylori*, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* possuem maior atividade antioxidante – *in vitro,* nos ensaios de DPPH, xantina oxidase e peroxidação lipídica, – e *in vivo*, na mucosa gástrica de camundongos submetidos à lesão por EtOH/HCl quando comparados à oleorresina.

14. Os tratamentos com a oleorresina e com os extratos das folhas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* diminuíram os níveis de MPO na mucosa gástrica, sugerindo que há diminuição do processo inflamatório em resposta ao EtOH/HCl.

15. As oleorresinas e extratos das folhas de *Copaifera* spp. inibem a atividade da enzima H^+, K^+-ATPase, de maneira concentração dependente, sugerindo que há diminuição da secreção de H+, e consequentemente diminuição da acidez estomacal, importante mecanismo no tratamento de distúrbios gástricos.

16. A oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico apresentam atividade sobre contorções abdominais induzidas por ácido acético e nocicepção espontânea induzida por formalina, sugerindo que há ação antinociceptiva à nível periférico, ou por inibição do sinal nociceptivo ou pela diminuição de mediadores que estimulam os nociceptores.

17. A oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico aumentam o tempo de latência no ensaio de retirada de cauda (*tail-flick*). Esses efeitos não foram alterados com a coadministração de naloxona, o que sugere que não há efeitos sobre receptores opoides, porém possa diminuir a transmissão do sinal nociceptivo por outras vias ou pela diminuição de mediadores que atuam sobre nociceptores.

18. A oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliático apresentam atividades antinociceptivas nos modelos de hiperalgesia mecânica induzida por formalina, carragenina, dextrana, LPS e zymosan. O efeito duradouro da inibição da nocicepção observada nestes experimentos pode ser uma possível inibição de mediadores relacionados à transmissão da resposta dolorosa. Outra hipótese é a diminuição da liberação de mediadores anti-inflamatórios que atuam diretamente sobre nociceptores, resultando assim em respostas antinociceptivas.

19. No modelo hiperalgesia mecânica associada à avulsão do plexo braquial (dor neuropática) os tratamentos com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico foram capazes de reduzir o quadro hiperalgésico de forma significativa. Esses resultados sugerem que a atividade da oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico anti-hiperalgésica possa estar interferindo nas vias periféricas e centrais de modulação da dor.

20. Os tratamentos com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico apresentam atividades antinociceptivas no modelo de hiperalgesia mecânica associada à avulsão do plexo braquial, sugerindo que o processo doloroso crônico

21. A oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico apresentaram potente atividade antiedematogênica nos ensaios de edema de pata induzido por carragenina, dextrana, LPS e zymosan. Esta atividade demonstrou ser dose-tempo-dependente, sugerindo que os tratamentos possam estar atuando tanto na fase aguda, quanto em fases mais tardias da inflamação.

22. O exsudato coletado no ensaio da bolsa de ar (*air pouch*) demonstrou que o tratamento com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico inibem a migração leucocitária para o local da inflamação causada por carragenina, dextrana ou zymosan, diminuindo o número total de leucócitos quando comparado com o grupo controle, e diminuindo os níveis de MPO, reforçando ainda mais a hipótese de atividade anti-inflamatória.

23. Os tratamentos com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico também foram capazes de reduzir a sensibilidade mecânica dos animais frente à hiperalgesia inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CFA, destacando as substâncias presentes na oleorresina, possivelmente seu componente majoritário – o ácido *ent*-poliáltico podem ser responsáveis pela atividade anti-hiperalgésica e anti-inflamatória observadas, sugerindo que estes podem ser alvos de futuros tratamentos em doenças inflamatórias e dolorosas crônicas, tais como a artrite reumatoide.

24. A oleorresina e suas substâncias isoladas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* apresentam atividade citotóxica em linhagem celular imortalizada THP-1, sendo confirmada através da determinação de percentual de células mortas por citometria de fluxo.

25. Os níveis de INF-γ, IL1-β, IL-6 e TNF-α foram reduzidos com o tratamento da oleorresina, extratos e substâncias isoladas de *C. oblongifolia* e *C. duckei* em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS. Os níveis de IL-10 foram parcialmente reduzidos com este tratamento. A ação sobre citocinas pró-inflamatórias sugere atividade anti-inflamatória tanto aguda quanto crônica, tendo em vista que o experimento possui os tempos de 24 h e 72h. Estes resultados ainda sugerem a participação de mecanismos antitumorais, confirmando a atividade citotóxica mais seletiva para linhagens neoplásicas (AGS e THP1).

26. O tratamento de células RAW 264.7-Luc com a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico apresentou diminuição da concentração de luciferase, correlacionada com a dimunuição da concentração de NFκB quando estimulados por LPS ou PGN. Estes resultados sugerem que a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico apresentam atividades anti-inflamatórias provavelmente por interferir na atividade dos receptores Toll-4 (LPS) e Toll-2 (PGN), interferindo assim em toda a via de sinalização do NFκB.

27. Com base nos resultados obtidos no atual trabalho quando comparados aos dados descritos na literatura, é possível sugerir que o efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico observado nos animais tratados a oleorresina de *C. duckei* e o ácido poliáltico atue interferindo nas vias de sinalização da dor e da inflamatória através da redução da expressão e/ou liberação de citocinas como o TNFα e na via de sinalização do NFκB, dependente de receptor Toll. A elucidação de um possível mecanismo de ação ainda se faz necessária frente a outros modelos *in vitro* e *in vivo* para a investigação das atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas.

28. As atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias observadas nos modelos de gastroproteção, anti-nociceptivos e anti-inflamtórios no tratamento com a oleorresina de *Copaifera* sp. ou suas substâncias isoladas podem ser resultado da diminuição da liberação ou síntese de mediadores relacionados à resposta inflamatória, resultando em diminuição do estímulo nociceptivo e/ou inflamatório. Os resultados apresentados neste estudo são inéditos, e contribuem para a validação etnofarmacológica atribuídas para as espécies de *Copaifera*.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, n. 1, p. 91–102, 1995.

ABBOTT, F. V.; MELZACK, R.; SAMUEL, C. Morphine analgesia in the tail-flick and Formalin pain tests is mediated by different neural systems. **Experimental Neurology**, v. 75, n. 3, p. 644–651, 1982.

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–41, 2004.

ABRÃO, F.; COSTA, L. D. DE A.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; CASTRO, P. T. DE; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 443, 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Illinois: Allured Pub Corporation, 2007. p. 804

ADZU, B.; BALOGUN, S. O.; PAVAN, E.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; AGUIAR, R. W. S.; RIBEIRO, R. V.; BESERRA, Â. M. S. E S.; OLIVEIRA, R. G. DE; SILVA, L. I. DA; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. D. O. Evaluation of the safety, gastroprotective activity and mechanism of action of standardised leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 378–389, 2015.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 9, p. 121–6, 1984.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1397–1421, 2006.

AKDIS, C. A.; BLASER, K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 1, p. 15–22, 2003.

AKDIS, C. A.; SIMONS, F. E. R. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 69–76, 2006.

AKIRA, S.; SATO, S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 555–62, 2003.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

ALARCÓN, T.; DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 1, p. 19–26, 1999.

ALAS, S.; EMMANOUILIDES, C.; BONAVIDA, B. Inhibition of interleukin 10 by

Rituximab results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 709–723, 2001.

ALBUQUERQUE, M. A. G. DE. **Medicinal, veterinary, and cosmetic formulations produced by broth fermentation of various types of fruit, herbs, or other vegetable products**Brazil, 2010.

ALBUQUERQUE, U. P. DE; MEDEIROS, P. M. DE; ALMEIDA, A. L. S. DE; MONTEIRO, J. M.; FREITAS LINS NETO, E. M. DE; MELO, J. G. DE; SANTOS, J. P. DOS. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

ALENCAR, J. DA C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo resina. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 75–89, 1982.

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, 2013.

ALMEIDA, M. Z. DE. **Plantas Medicinais**. 3. ed. Salvador: Editora da Universidade Federal da Bahia, 2011.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1-2, p. 40–56, 2004.

ALQASOUMI, S.; AL-SOHAIBANI, M.; AL-HOWIRINY, T.; AL-YAHYA, M.; RAFATULLAH, S. Rocket "*Eruca sativa*": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 16, p. 1958–1965, 2009.

ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; DE AZEVEDO BENTES MONTEIRO NETO, M.; FURTADO, R. A.; SENEDESE, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 854–860, 2013.

AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; LANZ, I.; DONNERER, J. Histamine-induced edema in the rat paw — effect of capsaicin denervation and a CGRP receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 279, n. 2-3, p. 227–231, jun. 1995.

ANAND, P.; BIRCH, R. Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates. **Brain: a journal of neurology**, v. 125, n. Pt 1, p. 113–122, 2002.

ANDRADE, S. F. DE; LEMOS, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 252–257, 2007.

AOYAMA, T.; INO, Y.; OZEKI, M.; ODA, M.; SATO, T.; KOSHIYAMA, Y.; SUZUKI, S.; FUJITA, M. Pharmacological studies of FUT-175, nafamstat mesilate. I. Inhibition of

protease activity *in vitro* and *in vivo* experiments. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 203–227, 1984a.

ARAÚJO, T. A. DE S.; MELO, J. G. DE; FERREIRA-JÚNIOR, W. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal Plants. In: ALBUQUERQUE, U. P.; ALVES, R. R. N. (Eds.). . **Introduction to Ethnobiology**. Allschwilerstrasse, Basel, Suíça: Springer International Publishing, 2016. p. 143–149.

AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1445–1451, 1991.

ARIYOSHI, T.; ARAKAKI, M.; IDEGUCHI, K.; ISHIZUKA, Y.; IDE, H. Studies on the Metabolism of d -Limonene (p -Mentha-1,8-diene): III. Effects of d -Limonene on the Lipids and Drug-Metabolizing Enzymes in Rat Livers. **Xenobiotica**, v. 5, n. 1, p. 33–38, 22 jan. 1975.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, n. 10, p. 905–9, out. 2003.

ATOLANI, O.; OLATUNJI, G. A. Isolation and evaluation of antiglycation potential of polyalthic acid (furano-terpene) from Daniella oliveri. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 6, p. 407–411, 2014.

AUSTIN, C. A.; SHEPHARD, E. A.; PIKE, S. F.; RABIN, B. R.; PHILLIPS, I. R. The effect of terpenoid compounds on cytochrome P-450 levels in rat liver. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 11, p. 2223–9, 1 jun. 1988.

AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. **Experientia**, v. 47, n. 1, p. 22–31, 1991.

BAGCHI, D.; BHAITACHARYA, G.; STOHS, S. J. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. **Free Radical Research**, v. 24, n. 6, p. 439–450, 1996.

BAGDAS, D.; MULDOON, P. P.; ALSHARARI, S.; CARROLL, F. I.; NEGUS, S. S.; DAMAJ, M. I. Expression and pharmacological modulation of visceral pain-induced conditioned place aversion in mice. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 236–243, 2016.

BAILÓN, E.; COMALADA, M.; ROMÁN, J.; MICHELENA, P.; RAMIS, I.; MERLOS, M.; NIETO, A.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. UR-1505, a salicylate able to selectively block T-cell activation, shows intestinal anti-inflammatory activity in the chronic phase of the DSS model of rat colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 7, p. 888–897, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALEKAR, N.; KATKAM, N. G.; NAKPHENG, T.; JEHTAE, K.; SRICHANA, T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 141, n. 3, p. 817–824, 2012a.

BALEKAR, N.; NAKPHENG, T.; KATKAM, N. G.; SRICHANA, T. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1178–1184, 2012b.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.

BARATTO, M. C.; TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; ROMANI, A.; VISIOLI, F.; BASOSI, R.; POGNI, R. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. **Free radical research**, v. 37, n. 4, p. 405–412, 2003.

BARRANCO, S. C.; TOWNSEND, C. M.; CASARTELLI, C.; MACIK, B. G.; BURGER, N. L.; BOERWINKLE, W. R.; GOURLEY, W. K. Establishment and characterization of an *in vitro* model system for human adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Research**, v. 43, n. 43, p. 1703–1709, 1983a.

BARRANCO, S. C.; TOWNSEND, C. M.; QURAISHI, M. A.; BURGER, N. L.; NEVILL, H. C.;

BARRETT, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. **Ganong's Review of medical physiology**. 24. ed. New York, NY, USA: McGraw-Hill Education/Medical, 2012.

BARROS, M. P. DE; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. DE. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 372–377, 2008.

BARTON, N. J.; STEVENS, D. A.; HUGHES, J. P.; ROSSI, A. G.; CHESSELL, I. P.; REEVE, A. J.; MCQUEEN, D. S. Demonstration of a novel technique to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 4, p. 13, 2007.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A.; FREITAS, P. C.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101–9, jan. 1988.

BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.; DE SOUZA, G. H. B.; PEDRAZZI, A. H. P.; SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxyllum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 279–282, 2001.

BASUDHAR, D.; BHARADWAJ, G.; CHENG, R. Y.; JAIN, S.; SHI, S.; HEINECKE, J. L.; HOLLAND, R. J.; RIDNOUR, L. A.; CACERES, V. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; PAOLOCCI, N.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, C. A.; WINK, D. A.; MIRANDA, K. M. Synthesis and chemical and biological comparison of nitroxyl- and nitric oxide-releasing diazeniumdiolate-based aspirin derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 7804–7820, 2013.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.

Trends in Cell Biology, v. 11, n. 9, p. 372–377, 2001.

BAXTER, J. H.; BEAVEN, M. A.; HORÁKOVÁ, Z. Effects of adrenergic agents, theophylline and other drugs on dextran edema and histamine release in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, n. 7, p. 1211–1217, abr. 1974.

BD Accuri™ C6 Software para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Franklin Lakes, NJ, EUABecton Dickinson Biosciences, Accuri®Cytometers, , 2011. Disponível em: <www.AccuriCytometers.com>

BECK, N. **Diagnostic Hematology**. London, UK: Springer London, 2009.

BELLEZZA, I.; MIERLA, A.; GROTTELLI, S.; MARCOTULLIO, M. C.; MESSINA, F.; ROSCINI, L.; CARDINALI, G.; CURINI, M.; MINELLI, A. Furanodien-6-one from *Commiphora erythraea* inhibits the NF-kB signalling and attenuates LPS-induced neuroinflammation. **Molecular Immunology**, v. 54, n. 3-4, p. 347–354, 2013.

BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicologic pathology**, v. 27, n. 1, p. 134–142, 1999.

BENJAMIN, D.; KNOBLOCH, T. J.; DAYTON, M. A. Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. **Blood**, v. 80, n. 5, p. 1289–1298, 1992.

BERMAN, J. S.; BIRCH, R.; ANAND, P. Pain following human brachial plexus injury with spinal cord root avulsion and the effect of surgery. **Pain**, v. 75, p. 199–207, 1998.

BERNAUER, U.; OBEREMM, A.; MADIE, S.; GUNDERT-REMY, U. The use of *in vitro* data in risk assessment. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 176–181, 2005.

BEUKELMAN, C. J.; HENRIETTE, C.; VAN UFFORD, Q.; KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J. J.; VAN DEN WORM, E. Discovery of new anti-inflammatory drugs from plant origin. **Annals of Gastroenterology**, v. 15, n. 4, p. 320–323, 2007.

BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. DA P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2006.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 6, p. 849–860, 2001.

BLACK, P. H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 622–653, 2002.

BLASER, M. J.; CHYOU, P. H.; NOMURA, A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. **Cancer Research**, v. 55, n. 3, p. 562–565, 1995.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 26 abr. 1958.

BONAN, R. F.; BONAN, P. R. F.; BATISTA, A. U. D.; SAMPAIO, F. C.; ALBUQUERQUE, A. J. R.; MORAES, M. C. B.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G. M.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E. *In vitro* antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 372–377, 2015.

BONATERRA, G. A.; HEINRICH, E. U.; KELBER, O.; WEISER, D.; METZ, J.; KINSCHERF, R. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. **Phytomedicine**, v. 17, n. 14, p. 1106–1113, dez. 2010.

BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. P.; KROON, E. G. Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion. **Immunology Letters**, v. 122, n. 1, p. 1–11, 2009.

BORDEN, E. C. Interferons: Pleiotropic cellular modulators. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1 PART 1, 1992.

BOUCHET, N.; BARRIER, L.; FAUCONNEAU, B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 159–162, 1998.

BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; ANTUNES, O. A. C.; PINTO, A. C. Terpenoids from *Copaiba cearensis*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 263–264, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. DOU. Diário Oficial da União.** Brasil, 2008. Disponível em: <http://www2.ib.usp.br/IB/files/Lei_11794.pdf>

BRASIL. **Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Minstério da Ciência, Tecnologia e Inovação.** Brasil, 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RDC n. 88, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos".** Brasil, 2004a.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RDC n. 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Brasil, 2004b.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RDC n. 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.** Brasil, 2010.

BRENNAN, F. M.; GREEN, P.; AMJADI, P.; ROBERTSHAW, H. J.; ALVAREZ-IGLESIAS, M.; TAKATA, M. Interleukin-10 regulates TNF-α-converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1106–1117, 2008.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí, SC, Brasil: UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí, 2003.

BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n. 2, p. 283–297, 2000.

BRUEHL, S.; HARDEN, R. N.; GALER, B. S.; SALTZ, S.; BERTRAM, M.; BACKONJA, M.; GAYLES, R.; RUDIN, N.; BHUGRA, M. K.; STANTON-HICKS, M. External validation of IASP diagnostic criteria for Complex Regional Pain Syndrome and proposed research diagnostic criteria. International Association for the Study of Pain. **Pain**, v. 81, n. 1-2, p. 147–54, 1999.

BRUNHAROTO, A. R. F.; BASTOS, J. K.; SILVA, A. A. B. E. **Method for preparing matrix microparticles of *Copaifera langsdorffii* (aerial parts) and for isolating the active principles therein; thus prepared analgesic, antispasmodic, anti-inflammatory, diuretic and antiseptic microparticles and compounds.** Brazil, 2011.

BRUNHAROTO, A. R. F.; BRUNHAROTO-JR, C. F.; BRUNHAROTO, L. P. F.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. **Process to obtain extracts, fractions and isolated compounds from *Copaifera* species and their use for the treatment of urinary lithiasis in humans and animals.** Brazil, 2005.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment - Polish achievements. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. S3, p. 99–126, 2003.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, n. C, p. 302–310, 1978.

BUENO, L.; FIORAMONTI, J.; DELVAUX, M.; FREXINOS, J. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: From basic to clinical investigations. **Gastroenterology**, v. 112, n. 5, p. 1714–1743, 1997.

BUI, H. X.; DEL ROSARIO, A.; SONBATI, H.; LEE, C. Y.; GEORGE, M.; ROSS, J. S. *Helicobacter pylori* affects the quality of experimental gastric ulcer healing in a new animal model. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 55, n. 3, p. 261–268, 1991.

BULUT, R.; ÜNLÜÇERÇI, Y.; BEKPINAR, S.; KUNTSAL, L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H+, K+-ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanol-induced injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 44, n. 7, p. 1417–1422, 1999.

BYRD-LEIFER, C. A.; BLOCK, E. F.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; DING, A. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. **European Journal of**

Immunology, v. 31, n. 8, p. 2448–2457, 2001.

CAI, X.; WONG, Y. F.; ZHOU, H.; LIU, Q.; XIE, Y.; JIANG, Z. H.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. **Inflammation Research**, v. 55, n. 9, p. 368–377, 2006.

CALCUTT, N. A.; MALMBERG, A. B.; YAMAMOTO, T.; YAKSH, T. L. Tolrestat treatment prevents modification of the formalin test model of prolonged pain in hyperglycemic rats. **Pain**, v. 58, n. 3, p. 413–420, 1994.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

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

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

CANNON, G. W.; WOODS, M. L.; CLAYTON, F.; GRIFFITHS, M. M. Induction of arthritis in DA rats by incomplete Freund's adjuvant. **Journal of Rheumatology**, v. 20, n. 1, p. 7–11, 1993.

CAO, Y. Q.; MANTYH, P. W.; CARLSON, E. J.; GILLESPIE, A. M.; EPSTEIN, C. J.; BASBAUM, A. I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 390–394, 1998.

CARLSTEDT, T.; ANAND, P.; HALLIN, R.; MISRA, P. V; NORÉN, G.; SEFERLIS, T. Spinal nerve root repair and reimplantation of avulsed ventral roots into the spinal cord after brachial plexus injury. **Journal of Neurosurgery**, v. 93, n. 2 Suppl, p. 237–247, 2000.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2051–2058, 1999.

CARVALHO, G. A.; NIKKHAH, G.; SAMII, M. Pain management after post-traumatic brachial plexus lesions. Conservative and surgical therapy possibilities. **Der Orthopäde**, v. 26, n. 7, p. 621–5, jul. 1997.

CARVALHO, J. C. T. ***Copaifera* oil standardized composition for treatment of gynecological disorders.** Brazil, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V; KAPLAN, M. A. C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946–950, 2005.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória: modulaçäo periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de**

Anestesiologia, v. 48, n. 2, p. 137–58, 1998.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773–778, 2000.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388–392, 2006.

CECHINEL-FILHO, V.; CAMPOS, F. DE; YUNES, R. A. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: Uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 230–241, 2003.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. Visceral pain. **Lancet**, v. 353, n. 9170, p. 2145–2148, 1999.

CHAMBERS, M. C. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012.

CHANG, E. B.; LEUNG, P. S. Gastric Physiology. In: LEUNG, P. S. (Ed.). . **The Gastrointestinal System**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 63–85.

CHATTOPADHYAY, I.; BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; MAITY, P.; BANERJEE, R. K. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 8, p. 1397–1408, 2006.

ChemBioDraw® para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Cambridge, MA, USACambridgeSoft, , 2009. Disponível em: <www.cambridgesoft.com>

CHEN, C.-H.; CHEN, P.-Y.; WANG, K.-C.; LEE, C.-K. Rapid identification of the antioxidant constituent of *Koelreuteria henryi*. **Journal of the Chinese Chemical Society (Taipei, Taiwan)**, v. 57, n. 3A, p. 404–410, 2010.

CHEN, W. Y. J.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, n. 2, p. 79–89, 1999.

CHOU, L.-W.; WANG, J.; CHANG, P.-L.; HSIEH, Y.-L. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 3, p. R90, 2011.

CHOU, T.-C. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 6, p. 1146–52, 2003.

CHU, S.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, n. 6, p. 587–593, nov. 2012.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards. Document M7-A7 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 26, n. 2, p. 2006, 2006a.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S16. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 25, n. 1, p. 2006, 2006b.

COLEMAN, J. W. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397–1406, 2001.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, 1968.

CONCEA. **Baixa o Capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA.Diário Oficial da União. Minstério da Ciência, Tecnologia e Inovação.** Brasil, 2015.

COOK, N. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66–76, fev. 1996.

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L. DE; SOUZA, D. P. DE; FREITAS, R. M. DE. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 567–575, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231–1234, 2002.

COSTA-MACHADO, A. R. M.; FREITAS, L. A. P.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 86–96, maio 2015.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 1–32, jun. 2009.

CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. **Current opinion in gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 495–502, 2000.

CUENI, L. N.; DETMAR, M. The lymphatic system in health and disease. **Lymphatic research and biology**, v. 6, n. 3-4, p. 109–22, 2008.

CUMMINS, D. **Oral compositions containing botanical extracts with**

antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging, and or healing properties. USA, 2009.

CUNHA, T. M.; DAL-SECCO, D.; VERRI, W. A.; GUERRERO, A. T.; SOUZA, G. R.; VIEIRA, S. M.; LOTUFO, C. M.; NETO, A. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, n. 1-3, p. 127–135, 2008.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755–60, 2005.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; CALAPAI, G.; NAVA, F.; CAPUTI, A. P. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Sciences**, v. 60, n. 3, p. 215–220, dez. 1996.

CZYZEWSKA, J.; GUZIŃSKA-USTYMOWICZ, K.; PRYCZYNICZ, A.; KEMONA, A.; BANDURSKI, R. Immunohistochemical assessment of Fhit protein expression in advanced gastric carcinomas in correlation with *Helicobacter pylori* infection and survival time. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 47, n. 1, p. 47–53, 2009.

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

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 219–224, 2004.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P.-O. Systemic inflammatory response syndrome. **British Journal of Surgery**, v. 84, p. 920–935, 1997.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; BECK, I. M.; VAN MOLLE, W.; HENNUYER, N.; HAPGOOD, J.; LIBERT, C.; STAELS, B.; LOUW, A.; HAEGEMAN, G. A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 44, p. 15827–15832, 2005.

DE FREITAS, O.; RAMOS, M. F. DE S.; HENRIQUES, M. DAS G. M.; ROSAS, E. C.; SIANI, A. C. **Volatile fraction of copaiba oleoresin, microencapsulation and therapeutic uses.** Brazil, 2007.

DE PAULA, A. C. B.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; SOUZA BRITO, A. R. M. The antiulcer effect of *Croton cajucara* Benth in normoproteic and malnourished rats. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 815–825, 2008.

DE WEERD, N. A.; SAMARAJIWA, S. A.; HERTZOG, P. J. Type I interferon receptors: Biochemistry and biological functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20053–20057, 2007.

DEMIRCI, S.; DOĞAN, A.; DEMIRCI, Y.; ŞAHIN, F. *In vitro* wound healing activity of methanol extract of *Verbascum speciosum*. **International Journal of Applied**

Research in Natural Products, v. 7, n. 3, p. 37–44, 2014.

DEN HARTOG, G.; CHATTOPADHYAY, R.; ABLACK, A.; HALL, E. H.; BUTCHER, L. D.; BHATTACHARYYA, A.; ECKMANN, L.; HARRIS, P. R.; DAS, S.; ERNST, P. B.; CROWE, S. E. Regulation of Rac1 and reactive oxygen species production in response to infection of gastrointestinal epithelia. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2016.

DENG, Y.; CHANG, C.; LU, Q. The inflammatory response in psoriasis: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunologyogy**, p. 377–389, 2016.

DEY, B.; DEY, R. J.; CHEUNG, L. S.; POKKALI, S.; GUO, H.; LEE, J.-H.; BISHAI, W. R. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 21, n. 4, p. 401–406, 2015.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69–91, 2002.

DINARELLO, C. A. Review article Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3733, 2011.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095–2147, 1996.

DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 14, n. 328(2), p. 106–113, 1993.

DOILLON, C. J.; DUNN, M. G.; BENDER, E.; SILVER, F. H. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. **Collagen and Related Research**, v. 5, n. 6, p. 481–492, 1985.

DOKMECI, D.; AKPOLAT, M.; AYDOGDU, N.; DOGANAY, L.; TURAN, F. N. L-carnitine inhibits ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacological Reports: PR**, v. 57, n. 4, p. 481–8, 2005.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E. K.; LANCTÔT, K. L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 2010.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. C, p. 161–174, 1977.

DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 720–41, out. 1997.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural product reports**, v.

23, n. 3, p. 394–411, 2006.

EDELMAYER, R. M.; VANDERAH, T. W.; MAJUTA, L.; ZHANG, E.-T.; FIORAVANTI, B.; DE FELICE, M.; CHICHORRO, J. G.; OSSIPOV, M. H.; KING, T.; LAI, J.; KORI, S. H.; NELSEN, A. C.; CANNON, K. E.; HEINRICHER, M. M.; PORRECA, F. Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 2, p. 184–193, fev. 2009.

EDWARDS, J. C.; SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system. **The Journal of Pathology**, v. 134, n. 2, p. 147–156, 1981.

EDWARDS, S. W.; HUGHES, V.; BARLOW, J.; BUCKNALL, R. Immunological detection of myeloperoxidase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **The Biochemical Journal**, v. 250, n. 1, p. 81–5, 15 fev. 1988.

EL-ASHMAWY, N. E.; KHEDR, E. G.; EL-BAHRAWY, H. A.; SELIM, H. M. Gastroprotective effect of garlic in indomethacin induced gastric ulcer in rats. **Nutrition**, v. 32, n. 7-8, p. 849–854, 2016.

EL-SAYED, A. M. **The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals**. Disponível em: <http://www.pherobase.com>.

EL-SHINNAWY, N. A.; ABD-ELMAGEID, S. A.; ALSHAILABI, E. M. A. Evaluation of antiulcer activity of indole-3-carbinol and/or omeprazole on aspirin-induced gastric ulcer in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 4, p. 357–75, 2014.

Empower™ para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Milford, MA, USAWaters Corporation, , 2010. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/Empower-3-Chromatography-Data-Software/nav.htm?cid=513188&locale=pt_BR>

EPSTEIN, F. H.; BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear Factor-κB — A pivotal Transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066–1071, 10 abr. 1997.

ESFAHANI, H. M.; ESFAHANI, Z. N.; DEHAGHI, N. K.; HOSSEINI-SHARIFABAD, A.; TABRIZIAN, K.; PARSA, M.; OSTAD, S. N. Anti-inflammatory and antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Alkanna frigida* and *Alkanna orientalis*. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 3, p. 447–452, 2012.

FANTINI, M.; BENVENUTO, M.; MASUELLI, L.; FRAJESE, G. V.; TRESOLDI, I.; MODESTI, A.; BEI, R. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9236–9282, 2015.

FARRELL, K. E.; CALLISTER, R. J.; KEELY, S. Understanding and targeting centrally mediated visceral pain in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAR, n. March, p. 1–4, 2014.

FAURE, P.; LAFOND, J.-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A. E.; CADET, J.;

KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J.-L. (Eds.). . **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. Allschwilerstrasse, Basel, Suíça: Birkhäuser Basel, 1995. p. 237–248.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369–394, 2006.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PESQUERO, J. B.; ARAÚJO, R. C.; BADER, M.; CALIXTO, J. B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 8, p. 1006–1012, dez. 2001.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL FILHO, V.; DE SOUZA, M. M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from Plinia glomerata (Myrtaceae) leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 235–9, 2008.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375–400., 1925.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. **ALTEX**, v. 19, n. 2, p. 73–8, 2002.

FlowJo® para sistema operacional Windows 8 (64 bits). San Carlos, CA, EUATree Star Inc., , 2013.

FOREMAN, R. D. Mechanisms of visceral pain: From nociception to targets. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 4, p. 457–463, 2004.

FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; BLANDIZZI, C. Pathophysiology of gastric ulcer development and healing: molecular mechanisms and novel therapeutic options. **Peptic Ulcer Disease**, p. 131–142, 2011.

FRAMPTON, V. Management of pain in brachial plexus lesions. **Journal of Hand Therapy**, v. 9, n. 4, p. 339–343, 1996.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, n. 3, p. 157–164, 2001.

FRANCHIN, M.; ROSALEN, P. L.; DA CUNHA, M. G.; SILVA, R. L.; COLÓN, D. F.; BASSI, G. S.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q.; BEUTLER, J. A.; CUNHA, T. M. Cinnamoyloxy-mammeisin isolated from

geopropolis attenuates inflammatory process by inhibiting cytokine production: involvement of MAPK, AP-1, and NF-κB. **Journal of Natural Products**, p. acs.jnatprod.6b00263, 2016.

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBAZ-PÉCLAT, V.; BUSSO, N.; SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis research & therapy**, v. 7, n. 2, p. R370–9, 2005.

FREITAS, F. F. B. P.; FERNANDES, H. B.; PIAUILINO, C. A.; PEREIRA, S. S.; CARVALHO, K. I. M.; CHAVES, M. H.; SOARES, P. M. G.; MIURA, L. M. C. V; LEITE, J. R. S. A.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, F. A. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 700–708, 2011.

FRESCO, P.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. M.; DINIZ, C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 114–134, 2010.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: Hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. 146832, p. 1–9, 2014.

FURTADO, R. A.; BERNARDES, C. T. V.; SILVA, M. N. DA; ZOCCAL, K. F.; FACCIOLI, L. H.; BASTOS, J. K. Antiedematogenic evaluation of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroethanolic extract and its major compounds. **BioMed Research International**, v. 2015, n. M, p. 1–7, 2015.

GADÓ, K.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. **Agents and Actions**, v. 32, n. 1-2, p. 119–121, 1991.

GARCIA LEME, J.; HAMAMURA, L.; LEITE, M. P.; ROCHA E SILVA, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **British Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 1, p. 88–96, 1973.

GARCIA, I.; POUZET, C.; BRULAS, M.; BAUZA, E.; BOTTO, J. M.; DOMLOGE, N. Evaluation of THP-1 cell line as an *in vitro* model for long-term safety assessment of new molecules. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 6, p. 568–574, 2013.

GARCÍA, M. .; FERNÁNDEZ, M. .; ALVAREZ, A.; SAENZ, M. . Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 69–73, mar. 2004.

GARRIDO, A. D. B.; LIA, R. C. C.; FRANCA, S. DE C.; SOUSA NETO, MANOEL DAMIAO DE SILVA, J. F. DA; ASTOLFI FILHO, S. **Endodontic sealant composition for preparation of endodontic cement and use of the composition.** Brazil, 2006.

GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1403–1408, 2003.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p. PL389–94, 1995.

GELGOR, L.; CARTMELL, S.; MITCHELL, D. Intracerebroventricular micro-injections of non-steroidal anti-inflammatory drugs abolish reperfusion hyperalgesia in the rat's tail. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 323–329, 1992.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408–414, 2007.

GHOSH, S.; BALTIMORE, D. **Activation *in vitro* of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B.Nature**, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157987>

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kB puzzle. **Cell**, v. 109, n. 2 SUPPL. 1, p. 81–96, 2002.

GIORDANO, J.; GERSTMANN, H. Patterns of serotonin- and 2-methylserotonin-induced pain may reflect 5-HT3 receptor sensitization. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, n. 2-3, p. 267–269, 2004.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, n. 4, p. 685–692, 2000.

GOLDSTEIN, D.; LASZLO, J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 38, n. 5, p. 258–77, 1957.

GOMES, N. DE M.; REZENDE, C. M. DE; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. DA C.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, 2010.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.

GONZALEZ, P.; BURGAYA, F.; ACARIN, L.; PELUFFO, H.; CASTELLANO, B.; GONZALEZ, B. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor-I are upregulated in glial cells after an excitotoxic injury to the postnatal rat brain. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 68, n. 4, p. 391–403, 2009.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **British Journal of Surgery**, v. 81, n. 5, p. 637–647, maio 1994.

GRAHAM, D. Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5191–5204, 2014.

GraphPad Prism® para sistema operacional Windows XP (64 bits). San Diego, CA, USAGraphPad Software, , 2007. Disponível em: <http://www.graphpad.com/>

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, p. 1–6, 2011.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GREEN, R. J.; DAFOE, D. C.; RAJFIN, T. A. Necrotizing Fasciitis. **Chest**, v. 110, n. 1, p. 219–229, jul. 1996.

GREGORY, J.; COWEY, A.; JONES, M.; PICKARD, S.; FORD, D. The anatomy, investigations and management of adult brachial plexus injuries. **Orthopaedics and Trauma**, v. 23, n. 6, p. 420–432, 2009.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt “Ueber einige Azoverbindungen”. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426–428, jan. 1879.

GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 33, n. 3 Suppl, p. 6S–15S, 1988.

GROOM, S. N.; JOHNS, T.; OLDFIELD, P. R. The potency of immunomodulatory herbs may be primarily dependent upon macrophage activation. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. April 2006, p. 73–79, 2007.

GRUBB, B. D. Peripheral and central mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 81, n. 1, p. 8–11, jul. 1998.

GRYGLEWSKI, R. J.; BOTTING, R. M.; VANE, J. R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, v. 12, p. 530–548, 1988.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; ARAÚJO, A. A. S.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

GUO, L.; YE, C.; CHEN, W.; YE, H.; ZHENG, R.; LI, J.; YANG, H.; YU, X.; ZHANG, D. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumorostatic agent. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 1, p. 10–16, 2008.

GUPTA, P. C.; RAO, C. V. Gastroprotective effect of standardized leaf extract from *Careya arborea* on experimental gastric ulcers in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 8, p. 1003–1008, 2014.

GUPTA, P. C.; RAO, C. V; SHARMA, N. Protective effect of standardized extract of *Cleome viscosa* against experimentally induced gastric lesions in the rat. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 595–600, 2013.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

GURTNER, G.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.

GUTIERREZ, V. P.; KONNO, K.; CHACUR, M.; SAMPAIO, S. C.; PICOLO, G.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V. O.; CURY, Y. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1-3, p. 84–92, 2008.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 54, n. 4, p. 469–87, dez. 2003.

HACHEM, C. Y.; CLARRIDGE, J. E.; REDDY, R.; FLAMM, R.; EVANS, D. G.; TANAKA, S. K.; GRAHAM, D. Y. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: Comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 24, n. 1, p. 37–41, 1996.

HALL, C. S.; BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. **Publications in Psycology, University of California**, v. 6, p. 1–12, 1932.

HANINEC, P.; SÁMAL, F.; TOMÁS, R.; HOUSTAVA, L.; DUBOVWÝ, P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, and end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury. **Journal of neurosurgery**, v. 106, n. 3, p. 391–9, 2007.

HANSSON, L. E.; NYREN, O.; HSING, A. W.; BERGSTROM, R.; JOSEFSSON, S.; CHOW, W. H.; FRAUMENI JR, J. F.; ADAMI, H. O. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 4, p. 242–249, 1996.

HARIZI, H.; CORCUFF, J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 10, p. 461–469, 2008.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894–901, 2008.

HAZZIT, M.; BAALIOUAMER, A.; VERÍSSIMO, A. R.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 714–721, 2009.

HEINRICH, M.; GIBBONS, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 425–432, 2001.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, 1990.

HEINRICHER, M. M.; TAVARES, I.; LEITH, J. L.; LUMB, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214–225, abr. 2009.

HERMANT, P.; MICHIELS, T. Interferon-λ in the context of viral infections: Production, response and therapeutic implications. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 5, p. 563–574, 2014.

HIURA, A.; NAKAGAWA, H. Roles of glia, immune cells and the thermo-TRP channels, TRPV1 , TRPA1 and TRPM8 , in pathological pain. **The Open Neuroscience Journal**, v. 6, p. 10–26, 2012.

HOEFLICH, K. P.; LUO, J.; RUBIE, E. A; TSAO, M. S.; JIN, O.; WOODGETT, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. **Nature**, v. 406, n. 6791, p. 86–90, 2000.

HOGG, J. C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. **The Lancet**, v. 364, n. 9435, p. 709–721, 2004.

HOLE, K.; TJØLSEN, A. The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. **Pain**, v. 53, n. 3, p. 247–254, 1993.

HORN, J. The proton-pump inhibitors: Similarities and differences. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 266–280, 2000.

HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 593–598, nov. 2006.

HOUGH, L. B. Cellular localization and possible functions for brain histamine: Recent progress. **Progress in Neurobiology**, v. 30, n. 6, p. 469–505, 1988.

HOUGH, L. B.; NALWALK, J. W.; LEURS, R.; MENGE, W. M. P. B.; TIMMERMAN, H. Antinociceptive activity of impentamine, a histamine congener, after CNS administration. **Life Sciences**, v. 64, n. 5, p. PL79–PL86, dez. 1998.

HOUGH, L. B.; RICE, F. L. H3 receptors and pain modulation: peripheral, spinal, and brain interactions. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 336, n. 1, p. 30–7, 2011.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69–76, 1985.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, v. 211, p. 177–182, 1992.

IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Brasília, DF, Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. v. 28

ISHIHARA, M.; ITO, M. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, n. 3, p.

209–215, 2002.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

JAHN, A. I.; GUNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: Do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 2-3, p. 171–178, 1997.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia, PA, USA: Lea & Febiger, 1993.

JAINU, M.; DEVI, C. S. S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 156–163, 2006.

JANSSENS, S.; TSCHOPP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 773–84, 2006.

JAYAPAL, K.; WLASCHIN, K.; HU, W.; YAP, G. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. **Chemical Engineering Progress**, v. 103, n. 10, p. 40–47, 2007.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H. Ø.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v. 25, n. 3, p. 313–323, 1986.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; KALSO, E.; LOESER, J. D.; RICE, A. S. C.; TREEDE, R.-D. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204–2205, 2011.

JESIC, S.; JOTIC, A.; TOMANOVIC, N.; ZIVKOVIC, M.; KOLAKOVIC, A.; STANKOVIC, A. Expression of Toll-Like Receptors 2, 4 and Nuclear Factor Kappa B in Mucosal Lesions of Human Otitis: Pattern and Relationship in a Clinical Immunohistochemical Study. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, 2014.

JOHNSON, E. O.; VEKRIS, M.; DEMESTICHA, T.; SOUCACOS, P. N. Neuroanatomy of the brachial plexus: Normal and variant anatomy of its formation. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 32, n. 3, p. 291–297, 2010.

JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 302–304, abr. 1968.

JORI, A.; BENTIVOGLIO, A. P.; GARATFINI, S. The mechanism of the local inflammatory reaction induced by compound 48/80 and dextran in rats. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 617–619, 1961.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Curitiba: Santos Editora, 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. Overview of the biology of type I interferons. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. Suppl 1, p. 1–9, 2010.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Burlington, MA, USA: Academic Press, 2008.

KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N.; TAESOTIKUL, T.; RUJJANAWATE, C.; KAEWPINIT, D.; SUDTHAYAKORN, R.; CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; PITASAWAT, B. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 359–365, 2004.

KASSIM, M.; ACHOUI, M.; MANSOR, M.; YUSOFF, K. M. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1196–1201, dez. 2010.

KATZ, L. B.; THEOBALD, H. M.; BOOKSTAFF, R. C.; PETERSON, R. E. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and dextran in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 230, n. 3, p. 670–677, 1984.

KAWASAKI, K.; AKASHI, S.; SHIMAZU, R.; YOSHIDA, T.; MIYAKE, K.; NISHIJIMA, M. Mouse Toll-like Receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2251–2254, 28 jan. 2000.

KEMMERLY, T.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 6, p. 642–649, nov. 2013.

KESSNER, D.; CHAMBERS, M.; BURKE, R.; AGUS, D.; MALLICK, P. ProteoWizard: Open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534–2536, 2008.

KETTLE, A. J.; ROBERTSON, I. G.; PALMER, B. D.; ANDERSON, R. F.; PATEL, K. B.; WINTERBOURN, C. C. Oxidative metabolism of amsacrine by the neutrophil enzyme myeloperoxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 9, p. 1731–8, 3 nov. 1992.

KEYSTONE, E.; SCHORLEMMER, H.; POPE, C.; ALLISON, A. Zymosan-Induced Arthritis: A model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis & Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1977.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223–246, 2003.

KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 4, p. 239, 2009.

KINOSHITA, M.; NOTO, T.; TAMAKI, H. Effect of a combination of ecabet sodium and

cimetidine on experimentally induced gastric lesions and gastric mucosal resistance to ulcerogenic agents in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 2, p. 223–6, fev. 1995.

KLAASSEN, C. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 8. ed. New York, NY, USA: McGraw-Hill Education/Medical, 2013.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase : friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, p. 598–625, 2005.

KLEGERIS, A.; MCGEER, P. L. Toxicity of human monocytic THP-1 cells and microglia toward SH-SY5Y neuroblastoma cells is reduced by inhibitors of 5-lipoxygenase and its activating protein FLAP. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. March, p. 369–378, 2003.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; SILVEIRA, A. C. D. O.; ROCHA, J. A. R.; BEBER, A. P.; WAGNER, T. M.; BRESOLIN, T. M. B.; BELLA-CRUZ, A.; CECHINEL-FILHO, V.; FALONI DE ANDRADE, S. Role of gastric mucus secretion, oxinitrergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 767–776, 2013.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SANTIN, J. R.; NIERO, R.; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. The therapeutic lead potential of metabolites obtained from natural sources for the treatment of peptic ulcer. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 567–616, 2012.

KNAPP, S.; DE VOS, A. F.; FLORQUIN, S.; GOLENBOCK, D. T.; VAN DER POLL, T. Lipopolysaccharide binding protein Is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 12, p. 6747–6753, 1 dez. 2003.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: A universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, n. 4, p. 427–437, 2004.

KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V. O.; CAMARGO, A. C. M.; CURY, Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake Crotalus durissus terrificus. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293–1304, 2008.

KONTUREK, P. C. H.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J.; STACHURA, J.; KARCZEWSKA, E.; PAJDO, R.; GHIARA, P.; HAHN, E. G. Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: Studies of gastric function and ulcer healing. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 3, p. 333–346, 1999.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, J. W.; PAWLIK, W. W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 507–530, 2005.

KOSIF, R.; YILMAZ, F.; EVRENDILEK, G. A.; DIRAMALI, M. Histopathological effects

of *Aloe barbadensis* and soybean oil on rat liver. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 4, p. 1101–1106, dez. 2010.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412–430, 1959.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344–50, 1984.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. DE A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 3, p. 199–206, 2006.

KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes the good, the bad, or the Indifferent? **Diabetes**, v. 54, n. suppl 2, p. S114–S124, 2005.

KUBO, K.; UEHARA, A.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORIYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K.; KOHGO, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H+, K+-Adenosine triphosphatase in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 10, p. 944–951, 1995.

KUMAR, A. P.; PIEDRAFITA, F. J.; REYNOLDS, W. F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism Involving the-463GA promoter polymorphism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 8300–8315, 2004.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing - Exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 103–113, 2007.

KUNKEL, S. L.; STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. W.; CAMPBELL, D. A.; REMICK, D. G. The role of TNF in diverse pathologic processes. **Biotherapy**, v. 3, n. 2, p. 135–141, 1991.

KVIETYS, P. R.; YAQINUDDIN, A.; AL KATTAN, W. Gastrointestinal mucosal defense system. In: GRANGER, D. N.; GRANGER, J. P. (Eds.). . **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**. New York, NY, USA: Morgan & Claypool, 2014. v. 6p. 1–172.

KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; PAWLIK, M. W.; PAWLIK, W. W.; KWIECIEŃ, N.; KONTUREK, S. J. Gastroprotection by pentoxyfilline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 337–355, 2004.

KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39–50, 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and

cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41–60, 2008.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. DE S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A. DA; VEIGA-JUNIOR, V. F. DA. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866–3889, 2012.

LEE, H.-N.; SURH, Y.-J. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1340–1350, 2012.

LEE, Y. C. Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. **Current Rheumatology Reports**, v. 15, n. 1, p. 300, 2013.

LEGRAIN, V.; IANNETTI, G. D.; PLAGHKI, L.; MOURAUX, A. The pain matrix reloaded: A salience detection system for the body. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 1, p. 111–124, 2011.

LEMOS, M.; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOEING, T.; DE SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: Evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 3, p. 238–245, 2015.

LI, G. Q.; XIA, H. H. X.; CHEN, M. H.; TSUKAMOTO, T.; TATEMATSU, M.; GU, Q.; QIAO, L.; CHO, C. H.; SO, W. H. L.; YUEN, M. F.; HU, P. J.; LIANG, Y. J.; LIN, H. L.; CHAN, A. O. O.; WONG, B. C. Y. Effects of aspirin on the development of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and heterotopic proliferative glands in *Mongolian gerbils*. **Helicobacter**, v. 13, n. 1, p. 20–29, 2008.

LI, H.; LIN, X. Positive and negative signaling components involved in TNFα-induced NF-κB activation. **Cytokine**, v. 41, n. 1, p. 1–8, jan. 2008.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007.

LIAO, J. C.; TSAI, J. C.; PENG, W. H.; CHIU, Y. J.; SUNG, P. J.; TSUZOKI, M.; KUO, Y. H. Anti-inflammatory activity of N-(3-Florophenyl)ethylcaffeamide in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15199–15211, 2013.

LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131–134, 2003.

LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. The role of innate mediators in inflammatory response. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 12-13, p. 887–890, 2001.

LILES, W. C.; VAN VOORHIS, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1573–80, dez. 1995.

LIMA, G. S.; CASTRO-PINTO, D. B.; MACHADO, G. C.; MACIEL, M. A. M.; ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, n. 12, p. 1133–1137, 2015.

LIMA, J. A.; OLIVEIRA, A. S.; DE MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of an acid fraction of the seeds of *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) (Flacourtiaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 1095–1103, 2005.

LIMA, M. D. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE SANTANA, W. A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112–117, 2013.

LIMA, S. R. M.; VEIGA, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003a.

LIMA, S. R. M.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003b.

LIMA-NETO, J. DE S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1078–1080, 2008.

LINARDI, A.; COSTA, S. K.; DA SILVA, G. R.; ANTUNES, E. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exudation and paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. **European journal of pharmacology**, v. 399, n. 2-3, p. 235–42, 7 jul. 2000.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. **NIST Chemistry webBook, NIST Standard Reference Database Number 69**. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry>. Acesso em: 23 maio. 2014.

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. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 1, p. 261–267, 1982.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001a.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001b.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

LOO, A. E. K.; HALLIWELL, B. Effects of hydrogen peroxide in a keratinocyte-fibroblast co-culture model of wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, n. 2, p. 253–258, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas . 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.** 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LU, H.; GRAHAM, D. Y. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 3, n. 4, p. 431–437, 2006.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008.

LUCCA, L. G.; DE MATOS, S. P.; BORILLE, B. T.; DE O. DIAS, D.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β-caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–148, fev. 2015.

LUQMAN, S.; PEZZUTO, J. M. NFκB: A promising target for natural products in cancer chemoprevention. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 7, p. 949–963, 2010.

MACHELSKA, H.; BRACK, A.; MOUSA, S. A; SCHOPOHL, J. K.; RITTNER, H. L.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 4, p. 772–80, 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–38, 2005.

MAEYER, E. DE; MAEYER-GUIGNARD, J. DE. Interferon-y. **Current Opinion in Immunology**, v. 4, n. 3, p. 321–326, 1992.

MAISTRO, E. L.; TAVARES CARVALHO, J. C.; CASCON, V.; COELHO KAPLAN, M. A. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 833–838, 2005.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K.; MCCOLL, K. EL. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449–1461, 2009.

MALHEIROS, A.; FILHO, V. C.; SCHMITT, C. B.; SANTOS, A. R. S.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J. B.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, v. 57, n. 1, p. 103–107, 2001.

MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, H.-J. Myeloperoxidase in kidney disease. **Kidney international**, v. 64, n. 6, p. 1956–67, dez. 2003.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological**, p. 23–53, 1977.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. **Hippocratic screen for pure or crude drug materialsLloydia**, 1962.

MARD, S. A.; MOJADAMI, S.; FARBOOD, Y.; KAZEM, M. G. N. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of gallic acid against mucosal inflammation- and erosions-induced by gastric ischemia-reperfusion in rats. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 4, p. 305–311, 2015.

MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B.; VAN WART, H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 10, p. 5666–70, 5 abr. 1990.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved *Bacilli* in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.

MARTIN, A.; CLYNES, M. Acid phosphatase: Endpoint for *in vitro* toxicity tests. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 27, n. 3, p. 183–184, 1991.

MARTIN, A.; CLYNES, M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. **Cytotechnology**, v. 11, n. 1, p. 49–58, 1993.

MARTÍN, M. J.; JIMÉNEZ, M. D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 10, p. 881–908, jul. 2001.

MASSON-MEYERS, D. S.; ANDRADE, T. A. M.; LEITE, S. N.; FRADE, M. A. C. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**, v. 3, n. 3, p. 10–20, 2013a.

MASSON-MEYERS, D. S.; ANDRADE, T. A. M.; LEITE, S. N.; FRADE, M. A. C. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**, v. 3, n. 3, p. 10–20, 2013b.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves,

endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. PL27–32, 1999.

MAZZOLENI, L. E. et al. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES trial. **Archives of internal medicine**, v. 171, n. 21, p. 1929–36, 28 nov. 2011.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 25 nov. 1969.

MCDOUGALL, J. J. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. **Arthritis research & therapy**, v. 8, n. 6, p. 220, 2006.

MEDEIROS, R. DA S.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 3, p. 282–288, 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. July, p. 428–435, 2008.

MELZACK, R.; WALL, R. D. **Pain mechanisms: a new theoryScience**, 1965.

MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**, v. 348, n. 1533-4406 (Electronic), p. 1243–1255, 2003.

MENDES, G. L.; SANTOS, A. R.; MALHEIROS, A.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, n. 1, p. 164–72, jan. 2000.

MERCURIO, F.; MANNING, A M. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6163–6171, 1999.

MICHEAU, O.; RG TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes of these receptors delivers a powerful and rapid proapo- ptotic signal through a DD-mediated recruitment of the adaptor protein FADD and the formation of the so-called. **Cell**, v. 114, p. 181–190, 2003.

MIGNANI, S.; HUBER, S.; TOMÁS, H.; RODRIGUES, J.; MAJORAL, J. P. Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 239–249, 2016.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MILLAN, M. J.; CZŁONKOWSKI, A.; PILCHER, C. W.; ALMEIDA, O. F.; MILLAN, M. H.; COLPAERT, F. C.; HERZ, A. A model of chronic pain in the rat: functional correlates of alterations in the activity of opioid systems. **The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 77–87, jan. 1987.

MILLER, E. K.; WALLIS, J. D. Executive function and higher-order cognition: definition and neural substrates. **Encyclopedia of Neuroscience**, v. 4, p. 99–104, 2010.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 939–945, 1983.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 240–264, 2006.

MOJŽIŠ, J.; HEGEDÜŠOVÁ, R.; MIROSSAY, L. **Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in ratsPhysiological Research**, 2000.

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacological**, v. 57, n. 2, p. 217–252, 2005.

MØLLER, P.; WALLIN, H.; KNUDSEN, L. E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. **Chemico-Biological Interactions**, v. 102, n. 1, p. 17–36, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MONDELLO, L. **Mass spectra of flavors and fragrances of natural and synthetic compounds with retention index - Wiley FFNSC Library**Hoboken, NJ, USAJohn Wiley & Sons Inc., , 2015.

MONROY, R. L.; SKELLY, R. R.; DAVIS, T. A.; MACVITTIE, T. J. Therapeutic evaluation of interleukin-1 for stimulation of hematopoiesis in primates after autologous bone marrow transplantation. **Biotherapy**, v. 4, n. 2, p. 97–108, 1992.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.

MSD. **Meso Scale Discovery**Gaithersburg, MDMeso Scale Diagnostics, , 2004.

MULDER, G. B.; PRITCHETT, K. Rodent analgesiometry: the hot plate, tail flick and Von Frey hairs. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science / American Association for Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 54–55, 2004.

MULLIN, J. M.; GABELLO, M.; MURRAY, L. J.; FARRELL, C. P.; BELLOWS, J.; WOLOV, K. R.; KEARNEY, K. R.; RUDOLPH, D.; THORNTON, J. J. Proton pump inhibitors: actions and reactions. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 13-14, p. 647–660, 2009.

MUNKER, R.; HILLER, E.; GLASS, J.; PAQUETTE, R. **Modern Hematology**. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2007.

MURAKAMI, S.; ARAI, I.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S.; BABA, K.; KIDO, T.; KOZAWA, M. Inhibition of gastric H+,K+-ATPase and acid secretion by cassigarol A, a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 33–37, 1992.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 6, p. 517–531, 2009.

MZmine® para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Boston, MA, USAMZmine Development Team, , 2015. Disponível em: <http://mzmine.sourceforge.net/>

NADEEM, A.; MASOOD, A.; SIDDIQUI, N. Oxidant - antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 2, n. 4, p. 215–35, ago. 2008.

NADER, H. B.; TERSARIOL, I. L. S.; DIETRICH, C. P. Antihemostatic activity of heparin disaccharides and oligosaccharides obtained by chemical and enzymatic fragmentation: Reversal of the hemorrhagic activity by ATP and myosin. **Thrombosis Research**, v. 54, n. 3, p. 207–214, 1989.

NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 490–7, 2003.

NAHRENDORF, M.; SOSNOVIK, D.; CHEN, J. W.; PANIZZI, P.; FIGUEIREDO, J. L.; AIKAWA, E.; LIBBY, P.; SWIRSKI, F. K.; WEISSLEDER, R. Activatable magnetic resonance imaging agent reports myeloperoxidase activity in healing infarcts and noninvasively detects the antiinflammatory effects of atorvastatin on ischemia-reperfusion injury. **Circulation**, v. 117, n. 9, p. 1153–1160, 2008.

NAIK, Y.; JAYARAM, S.; HARISH NAYAKA, M. A.; LAKSHMAN; DHARMESH, S. M. Gastroprotective effect of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) extract: Possible involvement of H+-K+-ATPase inhibition and antioxidative mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 173–179, 2007.

NAKAHARA, J.; MAEDA, M.; AISO, S.; SUZUKI, N. Current concepts in multiple sclerosis: Autoimmunity versus oligodendrogliopathy. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 42, n. 1, p. 26–34, 2012.

NAYAK, B. S.; PINTO PEREIRA, L. M. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 41, 2006.

NEUGEBAUER, V.; GALHARDO, V.; MAIONE, S.; MACKEY, S. C. Forebrain pain mechanisms. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 226–242, 2009.

NISHIOKA, K.; NAGAO, T.; URUSHIDANI, T. Correlation between acid secretion and

proton pump activity during inhibition by the proton pump inhibitors omeprazole and pantoprazole. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 8, p. 1349–59, 1999.

NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K. Flavonoids and methoxy-galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6939–45, 2015.

NOGUEIRA-NETO, J.; LINDOSO, M. J. DE S.; COELHO, L. F.; CARVALHO, R. A. F.; RODRIGUES, T. G. P. DE M.; ARAÚJO, A. G. P. DE; GIRÃO, M. J. B. C.; SCHOR, E. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. Suppl.2, p. 20–24, 2011.

NØRSETT, K. G.; LAEGREID, A.; LANGAAS, M.; WÖRLUND, S.; FOSSMARK, R.; WALDUM, H. L.; SANDVIK, A. K. Molecular characterization of rat gastric mucosal response to potent acid inhibition. **Physiological genomics**, v. 22, n. 1, p. 24–32, 2005.

NYKROVA, L. E. **A herbal preparation containing antioxidant component derived from plants**Russia, 2000.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 59–65, 2006.

OECD. **Test No. 408: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in RodentsOECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris**. [s.l: s.n.].

OECD. **Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948362.pdf\nhttp://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en>.

OH, P.-S.; LEE, S.-J.; LIM, K.-T. Glycoprotein isolated from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits inflammation-related protein and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 111–6, 2007.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889–2892, dez. 1994.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. August, p. 1321–1341, 2005.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **International**

Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 39, n. 3, p. 490–496, 2007.

OLIVEIRA, F. D. S.; SOUSA, D. P. DE; ALMEIDA, R. N. DE. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 588–91, 2008.

OLIVEIRA, P. G.; BRENOL, C. V.; EDELWEISS, M. I.; MEURER, L.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 4, p. 184–187, 2007.

OLIVEIRA, R. R. B.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, R. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 672–676, 2009.

OLIVER, G.; ALITALO, K. The Lymphatic vasculature : recent progress and paradigms. 2005.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Research**, v. 912, n. 2, p. 171–175, 2001.

OOI, K. L.; MUHAMMAD, T. S. T.; TAN, M. L.; SULAIMAN, S. F. Cytotoxic, apoptotic and anti-α-glucosidase activities of 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 685–695, jun. 2011.

OriginPro® para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Northampton, MA, USAOriginLab Corporation, , 2013. Disponível em: <<http://www.originlab.com/>>

ORLANDI, L.; VILELA, F. C.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; DIAS, D. F.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1469–1476, 2011.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: An integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661–674, 2013.

OTAMIRI, T.; SJÖDAHL, R. Oxygen radicals: their role in selected gastrointestinal disorders. **Digestive Diseases (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 133–41, 1991.

OZBAYER, C.; KURT, H.; OZDEMIR, Z.; TUNCEL, T.; MOHEB SAADAT, S.; BURUKOGLU, D.; SENTURK, H.; DEGIRMENCI, I.; GUNES, H. V. Gastroprotective, cytoprotective and antioxidant effects of *Oleum cinnamomi* on ethanol induced damage. **Cytotechnology**, v. 66, n. 3, p. 431–441, 2014.

OZENCI, V.; KOUWENHOVEN, M.; HUANG, Y. M.; XIAO, B.; KIVISÄKK, P.; FREDRIKSON, S.; LINK, H. Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-beta-1b treatment. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 49, n. 5, p. 554–61, 1999.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZE??, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: Substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315–327, 2007.

PAIVA, L. A. F.; CUNHA, K. M. DE A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffi* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 737–739, 2002.

PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73–78, 1998.

PAOLICELLI, D.; DIRENZO, V.; TROJANO, M. Review of interferon beta-1β in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis. **Biologics : targets & therapy**, v. 3, p. 369–376, 2009.

PAREJO, I.; CODINA, C.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 3, p. 507–512, 2000.

PARK, K. Drug delivery research: the invention cycle. **Molecular Pharmaceutics**, p. acs.molpharmaceut.6b00015, 17 mar. 2016.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, 2001.

PARRATT, J. R.; WEST, G. B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, eggwhite and compound 48/80. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 13, n. 1, p. 65–70, mar. 1958.

PARRY, W. C. B. Pain in avulsion lesions of the brachial plexus. **Pain**, v. 9, n. 1, p. 41–53, ago. 1980.

PARSONNET, J. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. **Gut**, v. 43 Suppl 1, n. September 2009, p. S6–9, 1998.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 5–16, 2012.

PAYÁ, M.; TERENCIO, M. C.; FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Involvement of secretory phospholipase A2 activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 8, p. 1773–9, 1996.

PERKINS, N. . M.; TRACEY, D. . J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 745–757, 2000.

PETIWALA, S. M.; JOHNSON, J. J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 93–102, 2015.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M. E. V; HENRIKSNÄS, J.; PETERSSON, J.; GENDLER, S. J.; SANDLER, S.; PERSSON, A E. G.; HANSSON, G. C.; HOLM, L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 295, n. 4, p. G806–12, 2008.

PICK, N.; CAMERON, S.; ARAD, D.; AV-GAY, Y. Screening of compounds toxicity against human monocytic cell line-THP-1 by flow cytometry. **Biological Procedures Online**, v. 6, n. 1, p. 220–225, 2004.

PIERSON, W.; LISTON, A. A new role for interleukin-10 in immune regulation. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, n. 8, p. 769–770, 2010.

PIN, E. G. **Preparation method for oral phytotherapeutic composition for human and veterinary use.** Brazil, 2007.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; ZARPELON, A. C.; MIZOKAMI, S. S.; BORGHI, S. M.; BORDIGNON, J.; SILVA, R. L.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF-κB activation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 8–14, 2016.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 355–360, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

PITTALUGA, A.; OLIVERO, G.; DI PRISCO, S.; MEREGA, E.; BISIO, A.; ROMUSSI, G.; GRILLI, M.; MARCHI, M. Effects of the neoclerodane hardwickiic acid on the presynaptic opioid receptors which modulate noradrenaline and dopamine release in mouse central nervous system. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 354–359, 2013.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; ORESIC, M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 395, 2010.

POLTORAK, A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331–8, 2004.

PRABHU, V.; SHIVANI, A. An overview of history, pathogenesis and treatment of perforated peptic ulcer disease with evaluation of prognostic scoring in adults. **Annals**

of medical and health sciences research, v. 4, n. 1, p. 22–29, 2014.

ProteoWizard® para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Nashville, TN, USAProteoWizard, , 2015. Disponível em: <http://proteowizard.sourceforge.net/>

PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. **The Journal of experimental medicine**, v. 108, n. 6, p. 945–956, 1958.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; PACHECO, C. M. D. F.; FONSECA, A. H.; KLEIN, A.; CALIARI, M. V.; FRANCISCHI, J. N. DE. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. **Mediators of Inflammation**, v. 2009, p. 1–7, 2009.

QUINTÃO, N. L. M.; BALZ, D.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor α. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 614–620, 2006.

QUINTÃO, N. L. M.; MEDEIROS, R.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. The effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. **Anesthesia and Analgesia**, v. 101, n. 6, p. 1763–1769, 2005.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, jun. 2002.

RAFFA, R. B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an “atypical” opioid analgesic. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 260, n. 1, p. 275–285, 1992.

RAINSFORD, K. D.; WHITEHOUSE, M. W. Biochemical gastroprotection from acute ulceration induced by aspirin and related drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, n. 9, p. 1281–1289, 1980.

RAJINDRAJITH, S.; DEVANARAYANA, N. M.; SILVA, H. J. DE. *Helicobacter pylori* infection in children. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 2, p. 86, 2009.

RANKINE, J. J. Adult traumatic brachial plexus injury. **Clinical Radiology**, v. 59, n. 9, p. 767–774, 2004.

RASBAND, W. S. **ImageJ® para sistema operacional Windows 7 (64 bits)**Bethesda, MD, USAU. S. National Institutes of Health, , 2016. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>

RASCHKE, W. C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261–267, 1978.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O’NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the

twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–531, 2002.

REMILA, S.; ATMANI-KILANI, D.; DELEMASURE, S.; CONNAT, J. L.; AZIB, L.; RICHARD, T.; ATMANI, D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 274–286, 2015.

RIBEIRO, A. R. S.; DINIZ, P. B. F.; PINHEIRO, M. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K^+ channels, and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 121–128, 2016.

RICE, N. R.; ERNST, M. K. *In vivo* control of NF-kappa B activation by I kappa B alpha. **The EMBO journal**, v. 12, n. 12, p. 4685–95, 1993.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10 SUPPL., 2008.

ROCHA, F. A. C.; ARAGÃO, A. G. M.; OLIVEIRA, R. C.; POMPEU, M. M. L.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485–490, 1999.

RODRIGUES-FILHO, R.; SANTOS, A. R. S.; BERTELLI, J. A.; CALIXTO, J. B. Avulsion injury of the rat brachial plexus triggers hyperalgesia and allodynia in the hindpaws: A new model for the study of neuropathic pain. **Brain Research**, v. 982, n. 2, p. 186–194, 2003.

RODRÍGUEZ-TÉLLEZ, M.; ARGÜELLES, F.; HERRERÍAS, J. M.; LEDRO, D.; ESTEBAN, J. Antiinflamatory agents less dangerous for gastrointestinal tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 10, p. 951–76, 2001.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO, S.; ECHTENACHER, B.; DI SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. **Mediators of inflammation**, v. 6, n. 1, p. 32–8, 1997.

ROMERO, A. L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos**. [s.l.] UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, 2007.

ROTHWELL, N. J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. C, p. 430–436, 1991.

RUIZ-MIYAZAWA, K. W.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; ZARPELON, A. C.; STAURENGO-FERRARI, L.; SILVA, R. L.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF-κB. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 9–17, 2015.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 89, n. 1, p. 91–95, 2003.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. Special ed ed. London: Methuen & Co., 1959.

RUSSO, R.; CORASANITI, M. T.; BAGETTA, G.; MORRONE, L. A. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

S. TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 16–27, 2012.

SABATER, F. P.; COURMONTAGNE, A. **Cosmetic or food compositions containing copaiba**, 1994.

SACHETTI, C. G.; CARVALHO, R. R. DE; PAUMGARTTEN, F. J. R.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1080–1085, 2011.

SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SÁEZ-LLORENS, X.; MCCRACKEN, G. H. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology, and management. **The Journal of Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 497–508, out. 1993.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; DARDENNE, M.; KANAAN, S. A.; ATWEH, S. F.; JABBUR, S. J.; SAADÉ, N. E. The role of cytokines and prostaglandin-E2 in thymulin induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 9, p. 1653–1661, 2000.

SAKURAI, K.; OSAKA, T.; YAMASAKI, K. Rebamipide reduces recurrence of experimental gastric ulcers: Role of free radicals and neutrophils. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. SUPPL. 1, p. 90–96, 2005.

SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: Natural inhibitors of NF-kB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 2979–2999, 2008.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 4, p. 829–838, 1996.

SAMAD, T. A; MOORE, K. A; SAPIRSTEIN, A; BILLET, S.; ALLCHORNE, A; POOLE, S.; BONVENTRE, J. V; WOOLF, C. J. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471–475, 2001.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 29265, 2016.

SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; GALILLY, R.; COHN, Z. A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 3, p. 699–703, 1991.

SANCHES, P. R. S.; CARNEIRO, B. M.; BATISTA, M. N.; BRAGA, A. C. S.; LORENZÓN, E. N.; RAHAL, P.; CILLI, E. M. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. **Amino acids**, v. 47, n. 7, p. 1433–43, 2015.

SÁNCHEZ-FAYOS CALABUIG, P.; MARTÍN RELLOSO, M. J.; PORRES CUBERO, J. C. La mucosa gástrica como estructura diana de agresiones proinflamatorias persistentes: modelos patogénicos de gastritis crónica. **Gastroenterologia y Hepatologia**, v. 32, n. 4, p. 294–306, 2009.

SANDVIK, A. K.; BRENNA, E.; WALDUM, H. L. Review article: the pharmacological inhibition of gastric acid secretion--tolerance and rebound. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 11, n. 6, p. 1013–8, 1997.

SANFORD, K. K.; EARLE, W. R.; LIKEKY, G. D. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. **Journal of Nacional Cancer Institute**, v. 9, n. 3, p. 229–246, 1948.

SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; MURBACH TELES ANDRADE, B. F.; MANGABEIRA DA SILVA, J. J.; ROGEZ, H. L. G.; CREVELIN, E. J.; BERALDO DE MORAES, L. A.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 70, n. C, p. 12–18, 2015.

SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SILVEIRA, A. C. DE O.; PETREANU, M.; ZERMIANI, T.; BELLA-CRUZ, A.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. DE. Gastroprotective and anti-*Helicobacter pylori* effects of a flavonoid rich fraction obtained from *Achyrocline satureoides* (Lam) D. C. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 417–422, 2014.

SANTOS, A. B. DOS; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; SANTOS, L. A.; SCHMIDT, T. M.; BAFFA, O. Antioxidant properties of plant extracts: An EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and spin trap DMPO. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1483–1492, 2009.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on Leishmania amazonensis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008.

SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 203–212, 2012.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F. Quimoluminescência e bioluminescência. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 200–209, 1993.

SAÚDE, M. DA. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Documentação e Informação SIA, 2009.

SAYERS, T. J.; MACHER, I.; CHUNG, J.; E.KUGLER. The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide and a chemically synthesized monosaccharide precursor . Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : **The Journal of Immunology**, v. 138, p. 2935–2940, 1987.

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2-3, p. 325–329, 2004.

SBCAL/COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65>. Acesso em: 11 maio. 2012.

SCHÄFERS, M.; SORKIN, L. S.; GEIS, C.; SHUBAYEV, V. I. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 347, n. 3, p. 179–182, 2003.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimanial. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 3, p. 340–347, 2002.

SCHILDBERGER, A.; ROSSMANITH, E.; EICHHORN, T.; STRASSL, K.; WEBER, V. Cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. **Mediator of Inflammation**, v. 2013, n. 697972, p. 1–10, 2013.

SCHMASSMANN, A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, v. 104, n. 3A, p. 43–51, 1998.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 523–532, 2009.

SCHMIDT, L.; BELOV, V. N.; GÖEN, T. Sensitive monitoring of monoterpene metabolites in human urine using two-step derivatisation and positive chemical ionisation-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 793, p. 26–36, 2013.

SCHNEIDER, C. A; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCHRECK, R.; ALBERMANN, K.; BAEUERLE, P. A. Nuclear factor kappa B: an

oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Radical Research Communications**, v. 17, n. 4, p. 221–37, 1992.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 598–603, nov. 2010.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842–1860, 2008.

SCHULTE, L. N.; EULALIO, A.; MOLLENKOPF, H.-J.; REINHARDT, R.; VOGEL, J. Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 10, p. 1977–1989, 2011.

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Chemical composition and seasonality of aromatic mediterranean plant species by NMR-based metabolomics. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, 2015.

SCOPARO, C. T.; BORATO, D. G.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SILVA, L. M.; MARIA-FERREIRA, D.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M. Gastroprotective bio-guiding fractionation of hydro-alcoholic extracts from green- and black-teas (*Camellia sinensis*). **Food Research International**, v. 64, p. 577–586, 2014.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**, v. 18, n. 3-4, p. 439–46, 1986.

SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 751–755, 2007.

SELYE, H. Induction of topical resistance to acute tissue injury; an experimental study with the granuloma pouch technique. **The Surgical Clinics of North America**, v. Oct, p. 1417–1446, 1953.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921–8, 1986.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

SHAFIEE, A.; BAGHERI, M.; SHEKARCHI, M.; ABDOLLAHI, M. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 6, n. 3, p. 360–362, 2003.

SHAH, P. J.; GANDHI, M. S.; SHAH, M. B.; GOSWAMI, S. S.; SANTANI, D. Study of *Mimusops elengi* bark in experimental gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 305–311, 2003.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, 2002.

SHAY, H.; KOMAROV, S.; FELS, S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43–61, 1945.

SHEFFIELD, E. A. The granulomatous inflammatory response. **Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, p. 1–2, 1990.

SHENKER, N.; HAIGH, R.; ROBERTS, E.; MAPP, P. I.; HARRIS, N.; BLAKE, D. R. Pain, neurogenic inflammation and symmetry in medical practice. **Pain Reviews**, v. 8, p. 27–34, 2001.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; GAO, W.; DING, J.; LI, P.; HU, L.; SHAO, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 187–192, 2014.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347–52, 1989.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–82, 1999.

SHINICHI, N.; KYOICHI, K.; SETSUO, T. Correlation between histamine content in exudate and degree of edema produced by dextran. **Biochemical Pharmacology**, v. 27, n. 22, p. 2641–2646, 1978.

SHINICHI, N.; KYOICHI, K.; SETSUO, T. Dextran-induced paw edema and 5-hydroxytryptamine release. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, n. 20, p. 3149–3150, 1979.

SHIRWAIKAR, A.; KHAN, S.; MALINI, S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 245–250, 2003.

SHOUVAL, D. S. et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 706–719, 2014.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 199–208, 2008.

SIKKA, G.; MILLER, K. L.; STEPPAN, J.; PANDEY, D.; JUNG, S. M.; FRASER, C. D.;

ELLIS, C.; ROSS, D.; VANDEGAER, K.; BEDJA, D.; GABRIELSON, K.; WALSTON, J. D.; BERKOWITZ, D. E.; BAROUCH, L. A. Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 128–135, 2013.

SILVA, E. G. DA; BEHR, G. A.; ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M. A. D B.; RAVAZOLO, L. G.; BORDIGNON, C. L.; SILVA, F. A. DA; ABOY, A. L.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1488–1496, 2007.

SILVA, S.; FILIPE, M. I.; PINHO, A. Variants of intestinal metaplasia in the evolution of chronic atrophic gastritis and gastric ulcer. A follow up study. **Gut**, v. 31, n. 10, p. 1097–1104, 15 jul. 1990.

SIMÕES, C. A. C. G. **Preparation method of copaifera (*Copaifera multijuga*) oil gel with antibacterial activity for the control of dental plaque or biofilm formation.** Brazil, 2006.

SINITOX. **Tabela 10. Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico. Brasil, 2003. FIOCRUZ/SINITOX**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/tab10_brasil2003.pdf>. Acesso em: 25 out. 2014.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A. T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical β-caryophyllene - Air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538–545, 2006.

SMITH, C. J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C. M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B. S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J. J.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13313–13318, 1998.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of leukocyte biology**, v. 56, n. 6, p. 672–686, 1994.

SMITH, P. C.; HOBISCH, A.; LIN, D. L.; CULIG, Z.; KELLER, E. T. Interleukin-6 and prostate cancer progression. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 12, p. 33–40, 2001.

SOMMER, C.; SCHÄFERS, M.; MARZINIAK, M.; TOYKA, K. V. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 6, n. 2, p. 67–72, 2001.

SONG, M.; PHELPS, D. S. Comparison of SP-A and LPS effects on the THP-1 monocytic cell line. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 1, p. L110–L117, 2000.

SORGELOOS, F.; KREIT, M.; HERMANT, P.; LARDINOIS, C.; MICHIELS, T. Antiviral type I and type III interferon responses in the central nervous system. **Viruses**, v. 5, n. 3, p. 834–857, 2013.

SOURIAL, S.; MARCUSSON-STÅHL, M.; CEDERBRANT, K. Meso scale discovery and Luminex comparative analysis of calbindin D28K. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1–6, 2009.

SOUSA, J. P. B.; BRANCALION, A. P. S.; SOUZA, A. B.; TURATTI, I. C. C.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; LOPES, N. P.; BASTOS, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653–659, 2011.

SOUZA, A. B.; DE SOUZA, M. G. M.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, M. R.; FURTADO, N. A. J. C.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; HELENO, V. C. G.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611–9619, 2011a.

SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. M.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; SOUSA, J. P. B. DE; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÕSIO, S. R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 215–220, 2011b.

SOUZA, M. DO C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; SANTOS, R. A. N. DOS; RAO, V. S.; SILVA, R. M. DA; MARTINS, D. T. DE O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 452–458, 2009.

SRIVASTAVA, S. K.; RAMANA, K. V. Focus on molecules: Nuclear factor-kappaB. **Experimental Eye Research**, v. 88, n. 1, p. 2–3, 2009.

STEPANOVIĆ-PETROVIĆ, R. M.; TOMIĆ, M. A.; VUČKOVIĆ, S. M.; PARANOS, S.; UGREŠÍC, N. D.; PROSTRAN, M. Š.; MILOVANOVIĆ, S.; BOŠKOVIĆ, B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1897–1903, 2008.

STILLS, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 46, n. 3, p. 280–293, 2005.

STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R. R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 7, n. 1, p. 13–27, 2002.

SUDSAI, T.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; NAKPHENG, T.; TEWTRAKUL, S. Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 223–231, 2013.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: Studies from knockout mice. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 4, p. 289–314, 2000.

SUGINO, H.; ISHIKAWA, M.; NITODA, T.; KOKETSU, M.; JUNEJA, L. R.; KIM, M.;

YAMAMOTO, T. Antioxidative activity of egg yolk phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 551–554, 1997.

SUN, X. B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, n. 10, p. 699–704, 1991.

SVANES, C. Trends in perforated peptic ulcer: Incidence, etiology, treatment, and prognosis. **World Journal of Surgery**, v. 24, n. 3, p. 277–283, 2000.

SZEFEL, J.; PIOTROWSKA, M.; J. KRUSZEWSKI, W.; JANKUN, J.; LYSIAK-SZYDLOWSKA, W.; SKRZYPCZAK-JANKUN, E. Eicosanoids in prevention and management of diseases. **Current Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 13–25, 2011.

TABER, R. I.; LATRANYI, M. B. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by *p*-chlorophenylalanine (PCPA). **European Journal of Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 215–222, nov. 1981.

TACKEY, E.; LIPSKY, P. E.; ILLEI, G. G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 13, n. 5, p. 339–43, 2004.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 418–26, 1969.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.

TAKEUCHI, K.; UKAWA, H.; KATO, S.; FURUKAWA, O.; ARAKI, H.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP3. **Gastroenterology**, v. 117, n. 5, p. 1128–1135, 1999.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 4, p. 625–635, abr. 2001.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TAN, P. V.; PENLAP, V. B.; NYASSE, B.; NGUEMO, J. D. B. Anti-ulcer actions of the bark methanol extract of *Voacanga africana* in different experimental ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 3, p. 423–428, 2000.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Quimica Nova**, v. 27, n. 2, p. 236–240, 2004.

TARAYRE, J. P.; DELHON, A.; ALIAGA, M.; BARBARA, M.; BRUNIQUEL, F.; CAILLOL, V.; PUECH, L.; CONSUL, N.; TISN??-VERSAILLES, J. Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice. 1: Zymosan-induced paw oedema

in rats and mice. **Pharmacological Research**, v. 21, n. 4, p. 375–384, 1989.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 1, p. 126–132, 2013.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. SUPPL. 1, p. 24–33, 2005.

TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7575–7584, 1995.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183–196, 2002.

TEWTRAKUL, S.; TUNGCHAROEN, P.; SUDSAI, T.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; YODSAOUE, O. Antiinflammatory and wound healing effects of *Caesalpinia sappan* L. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 6, p. 850–856, 2015.

TEXEREAU, J.; CHICHE, J.-D.; TAYLOR, W.; CHOUKROUN, G.; COMBA, B.; MIRA, J.-P. The Importance of Toll-Like Receptor 2 Polymorphisms in Severe Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. Supplement 7, p. S408–S415, 2005.

Thermo Xcalibur® para sistema operacional Windows 7 (64 bits). Waltham, MA, USA. CD-ROM.Thermo Fischer Scientific, , 2011. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/>

THOMPSON-SNIPES, L.; DHAR, V.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W.; RENNICK, D. M. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 2, p. 507–10, 1991.

THORSEN, K.; SØREIDE, J. A.; KVALØY, J. T.; GLOMSAKER, T.; SØREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: Age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 3, p. 347, 2013.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. (Eds.). . **The Pharmacology of Pain**. Heidelberg, DEU: Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 1–20.

TRAVÉS, P. G.; PIMENTEL-SANTILLANA, M.; RICO, D.; RODRIGUEZ, N.; MIETHKE, T.; CASTRILLO, A.; THEODORAKIS, E. A.; MARTÍN-SANZ, P.; PALLADINO, M. A.; BOSCÁ, L. Anti-inflammatory actions of acanthoic acid-related diterpenes involve activation of the PI3K p110 γ/δ subunits and inhibition of NF-kB. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 8, p. 955–966, 2014.

TRINDADE, F. T. T.; STABELI, R. G.; PEREIRA, A. A.; FACUNDO, V. A.; SILVA, A. DE A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 464–470, 2013.

TSUCHIYA, S.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, Y.; OKUMURA, H.; NAKAE, S.; KONNO, T.; TADA, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. **Cancer Research**, v. 42, n. April, p. 1530–1536, 1982.

TUIN, A.; HUIZINGA-VAN DER VLAG, A.; VAN LOENEN-WEEMAES, A.-M. M. A.; MEIJER, D. K. F.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, p. G377–85, 2006.

VAJDOVICH, P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 31–123, 2008.

VAJJA, B. N. L.; JULURI, S.; KUMARI, M.; KOLE, L.; CHAKRABARTI, R.; JOSHI, V. D. Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 7, p. 901–909, 2004.

VALÉRIO, D. A. R.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; LEMOS, H. P.; DA COSTA, F. B.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, n. 1-2, p. 155–163, 2007.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 3, p. 463–471, jan. 1963.

VAN WAUWE, J. P.; GOOSSENS, J. G. Arabinogalactan- and dextran-induced ear inflammation in mice: Differential inhibition by H1-antihistamines, 5-HT-serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. **Agents and Actions**, v. 28, n. 1-2, p. 78–82, 1989.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prog Neurobiol**, v. 64, p. 327–363, 2001.

VARGAS, F. D. S.; ALMEIDA, P. D. O. DE; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. D. A.; NEWTON, P.; VASCONCELLOS, M. C. DE; VEIGA, V. F.; LIMA, E. S. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, 2015.

VASCONCELOS, A. F. F. DE; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1057–1060, 2002.

VEDULA, R. K.; RAVASIO, A.; LIM, C. T.; LADOUX, B. Collective cell migration: A mechanistic perspective. **Physiology**, v. 28, n. 6, p. 370–379, 2013.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, Â. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 6, p. 476–480, 2001.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Quimica Nova**, v. 20, n. 6, p. 612–615, 1997.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C.; CALIXTO, J. B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 10, p. 1405–1410, nov. 2006.

VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; DE SOUZA, M. M.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M. K.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 2, p. 233–40, 2001.

VIATOUR, P.; MERVILLE, M. P.; BOURS, V.; CHARIOT, A. Phosphorylation of NF-kB and IkB proteins: Implications in cancer and inflammation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 1, p. 43–52, 2005.

VIEIRA, R. C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J. J.; LINO, R. S.; BRITO, L. A. B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 358–366, 2008.

VIGUSHIN, D. M.; POON, G. K.; BODDY, A.; ENGLISH, J.; HALBERT, G. W.; PAGONIS, C.; JARMAN, M.; COOMBES, R. C. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 42, n. 2, p. 111–7, 1998.

VILCEK, J. Novel interferons. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 8–9, 2003.

VIVANCOS, G. G.; VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R. S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391–399, 2004.

VON FREY, M. Beiträge zur Physiologie der Schmertzsinns. Zweite Mittheilung. **Ber. Sächs. Ges. Wiss. Leipzig Math.-Phys. Kl.**, v. 46, p. 283–296, 1894a.

VON FREY, M. Beiträge zur Physiologie der Schmertzsinns. **Ber. Sächs. Ges. Wiss. Leipzig Math.-Phys. Kl.**, v. 46, p. 185–196, 1894b.

VON FREY, M. Beiträge zur Sinnesphysiologie der Haut. Dritte Mittheilung. **Ber. Sächs. Ges. Wiss. Leipzig Math.-Phys. Kl.**, v. 47, p. 166–184, 1895.

VON FREY, M. Untersuchungenüber die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut; Druckempfindung und Schmerz. **Abh. Sächs. Ges. Wiss., Math.-Phys. Kl.**, v. 23, p. 175–266, 1896.

WAIKAKUL, S.; WAIKAKUL, W.; PAUSAWASDI, S. Brachial plexus injury and pain: incidence and the effects of surgical reconstruction. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet**, v. 83, n. 7, p. 708–18, jul. 2000.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 1350-9047 (Print), p. 45–65, 2003.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1547–65, 2008.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 7, p. 731–40, 1996.

WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 11, p. 1003–1015, 2001.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512–520, 2000.

WALLACE, M. S.; WALLACE, A. M.; LEE, J.; DOBKE, M. K. Pain after breast surgery: A survey of 282 women. **Pain**, v. 66, n. 2-3, p. 195–205, 1996.

WANG, J. P.; RUAN, J. L.; CAI, Y. L.; LUO, Q.; XU, H. X.; WU, Y. X. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 1033–1038, 2011.

WANG, T.; WU, F.; JIN, Z.; ZHAI, Z.; WANG, Y.; TU, B.; YAN, W.; TANG, T. Plumbagin inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of the nuclear factor-kappa B and mitogen activated protein kinase signaling pathways in RAW 264 . 7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, n. December, p. 177–183, 2014.

WEHINGER, A.; TANCEVSKI, I.; SCHGOER, W.; ELLER, P.; HOCHEGGER, K.; MORAK, M.; HERMETTER, A.; RITSCH, A.; PATSCH, J. R.; FOEGER, B. Phospholipid transfer protein augments apoptosis in THP-1-derived macrophages induced by lipolyzed hypertriglyceridemic plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 4, p. 908–915, 2007.

WHO; UNICEF. **Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report**.

[s.l.] World Health Organization and United Nations Children's Fund Publications, 2000.

WILCOX, C. M.; HIRSCHOWITZ, B. I. Treatment strategies for Zollinger–Ellison syndrome. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 7, p. 1145–1157, 8 maio 2009.

WILLAIN-FILHO, A.; CECHINEL-FILHO, V.; OLINGER, L.; SOUZA, M. M. DE. Quercetin: Further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 6, p. 713–721, 2008.

WILLMENT, J. A.; LIN, H.-H.; REID, D. M.; TAYLOR, P. R.; WILLIAMS, D. L.; WONG, S. Y. C.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 9, p. 4569–73, 1 nov. 2003.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1–16, 1984.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiiflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 6, p. 544–547, 1962.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, p. 541–546, 2007.

WOOLF, C. J. Somatic pain--pathogenesis and prevention. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 169–76, 1995.

WOOLF, C. J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; MA, Q. P.; CRILLY, P.; WINTER, J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. **Neuroscience**, v. 62, n. 2, p. 327–331, 1994.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5472, p. 1765–1769, 2000.

WU, L.; PAREKH, V. V; GABRIEL, C. L.; BRACY, D. P.; MARKS-SHULMAN, P. A; TAMBOLI, R. A; KIM, S.; MENDEZ-FERNANDEZ, Y. V; BESRA, G. S.; LOMENICK, J. P.; WILLIAMS, B.; WASSERMAN, D. H.; VAN KAER, L. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. E1143–52, 2012.

XU, C.; DING, C.; ZHOU, N.; RUAN, X.-M.; GUO, B.-X. A polysaccharide from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger prevents damage to human gastric epithelial cells *in vitro* and to rat gastric mucosa *in vivo*. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 501–512, 2016.

XU, Z.; ZHOU, J.; CAI, J.; ZHU, Z.; SUN, X.; JIANG, C. Anti-inflammation effects of

hydrogen saline in LPS activated macrophages and carrageenan induced paw oedema. **Journal of Inflammation**, v. 9, n. 1, p. 2, 2012.

YAHIRO, K.; SHIRASAKA, D.; TAGASHIRA, M.; WADA, A.; MORINAGA, N.; KURODA, F.; CHOI, O.; INOUE, M.; AOYAMA, N.; IKEDA, M.; HIRAYAMA, T.; MOSS, J.; NODA, M. Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. **Helicobacter**, v. 10, n. 3, p. 231–239, 2005.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. IkB kinases: Key regulators of the NF-kB pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 72–79, 2004.

YAN, J.; LUO, Y.-H.; MAO, Y.-F. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in *Mongolian gerbils*. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 10, n. 6, p. 852–855, 2004.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: an overview. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 6, p. 1–8, 2015.

YANG, L.-L.; LEE, C.-Y.; YEN, K.-Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 157, n. 1, p. 65–75, 2000.

YANG, S.; YANG, A.; SU, S.; WANG, H.; WANG, N.; CHEN, Q. Neuronostatin induces hyperalgesia in formalin test in mice. **Neuroscience Letters**, v. 506, n. 1, p. 126–130, 2012.

YARROW, J. C.; PERLMAN, Z. E.; WESTWOOD, N. J.; MITCHISON, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 21, 2004.

YEDGAR, S.; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1373–1382, 2006.

YEH, M. M.; BRUNT, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 128, n. 5, p. 837–847, 2007.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; TOMII, T.; KANEKO, T.; IINUMA, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, S.; KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, v. 34, n. 6, p. 732–7, jun. 1993.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 147–152, 2001.

ZANATTA, F.; BECKER GANDOLFI, R.; LEMOS, M.; CARLOS TICONA, J.; GIMENEZ, A.; KURZ CLASEN, B.; CECHINEL FILHO, V.; FALONI DE ANDRADE, S. Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae). **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, n. 2, p. 312–317, 2009.

ZANBOORI, A.; TAMADDONFARD, E.; MOJTAHEDEIN, A. **Effects of chlorpheniramine and ranitidine on the visceral nociception induced by acetic acid in rats: Role of opioid systemPakistan Journal of Biological Sciences**, 2008.

ZHENG, Y. F.; XIE, J. H.; XU, Y. F.; LIANG, Y. Z.; MO, Z. Z.; JIANG, W. W.; CHEN, X. Y.; LIU, Y. H.; YU, X. D.; HUANG, P.; SU, Z. R. Gastroprotective effect and mechanism of patchouli alcohol against ethanol, indomethacin and stress-induced ulcer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 27–36, 2014.

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5288–5296, 2013.

Anexos

ANEXO I - Termo de consentimento para a coleta da *C. oblongifolia*

USINA SANTO ÂNGELO LTDA

U.S.A – Usina Santo Ângelo Ltda

Declaração de Consentimento

A Usina Santo Ângelo, situada na cidade de Pirajuba-Minas Gerais, consentiu que fossem extraídos óleo-resinas de espécies de *Copaifera* localizadas nas dependências da Usina, para fins de estudos Científicos, relativos ao projeto temático FAPESP 2011/13630-7, " Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de *Copaifera*."

Decriê Polastrine
Coordenador de Meio Ambiente
USA – Usina Santo Ângelo Ltda

USINA SANTO ÂNGELO LTDA.

Arthur Borges Jacob
Analista Ambiental
USA – Usina Santo Ângelo Ltda

Rodovia MG 427 – Km 77 - Fazenda São Cristóvão
Home Page www.usangelo.com.br
e-mail: usa@usangelo.com.br
Pirajuba – Minas Gerais – CEP 38210-000
Fone: (34) 3426-0000 Fax: (34) 3426-0015

Endereço para correspondência:
Rua Presidente Vargas, n° 701
Centro – Caixa Postal 26
Conceição das Alagoas – Minas Gerais
CEP: 38120-000

ANEXO II - Termo de autorização para bioprospecção do SISBIO/IBAMA

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35143-2	Data da Emissão: 09/08/2013 15:58	Data para Revalidação*: 08/09/2014

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Herve Louis Ghislain Rogez	CPF: 508.489.252-20
Título do Projeto: VALIDAÇÃO QUIMICA-FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Primeira coleta das oito espécies de copaíba selecionadas em campo (ano 2012)	07/2012	08/2012
2	Segunda coleta das oito espécies de copaíba selecionadas em campo (ano 2013)	07/2013	08/2013
3	Terceira coleta das oito espécies de copaíba selecionadas em campo (ano 2014)	07/2014	08/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso de infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O pesquisador estrangeiro Herve Louis Ghislain Rogez possui vínculo empregatício efetivo com instituição científica brasileira. Dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jonas Joaquim Mangabeira da Silva	Colaborador	702.676.182-04	4179991 SSP-PA	Brasileira
2	Jairo Kenupp Bastos	Coordenador Geral do Projeto	564.337.947-34	04781424-3 IFP-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PARAUAPEBAS	PA	FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS	UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 22587916

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 35143-2	Data da Emissão: 09/08/2013 15:58	Data para Revalidação*: 08/09/2014

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Herve Louis Ghislain Rogez	CPF: 508.489.252-20
Título do Projeto: VALIDAÇÃO QUIMICA-FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.749/0001-23

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 22587916

ANEXO III - Termo de autorização para ensaios farmacológicos *in vivo*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 12.1.1018.53.5), intitulado "ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *Copaifera*: *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer", de autoria de **Marivane Lemos e Jairo Kenupp Bastos,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 25/08/2014.

Colaboradores: Nara Lins Meira Quintão; Sérgio Faloni de Andrade; Cláudia Helena Pellizzon; Márcio Luis de Andrade e Silva; Wilson Roberto Cunha; Herve Louis Ghislan Rogez; José Maurício Sforcin; Sandra Helena Poliselli Farsky

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1018.53.5), entitled: "ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *Copaifera*: *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer", by **Marivane Lemos and Jairo Kenupp Bastos** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, August, 25 2014.

Duração prevista do projeto: 30/04/2014 a 27/04/2017

Ribeirão Preto, 26 de Agosto de 2014.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA

João Fernando Velho de Andrade Diniz
Secretário da CEUA

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526

ANEXO IV – Trabalhos publicados e submetidos durante o período do doutorado

6.1 Produção bibliográfica

6.1.1 Artigos completos submetidos para publicação

1. **LEMOS, M.**; SILVA, J. M. S.; SAMPAIO, B. L.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. Cytotoxicity, acute and repeated-dose toxicological studies of *Copaifera duckei* Dwyer and its major compound *ent*-polyalthic acid in Chinese hamster. Food and Chemical Toxicology.

2. MOTTA, E. V. S.; **LEMOS, M.**; COSTA, J. C., BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. Galloylquinic acid derivatives from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity. Chemico-Biological Interactions.

3. GUSHIKEN, L.; HUSSNI, C.; ROZZA, A.; PADOVANI, C.; TAKAHIRA, R.; MARTINS, C.; CAMPOS, B.; **LEMOS, M.**; POLIZELLO, M.; BASTOS, J. K.; PELLIZZON, C.. New topical formulation using *Copaifera langsdorffii* leaves promotes skin wound healing activity by vascularization and myofibroblast pathways. International Wound Journal.

6.1.2 Artigos completos publicados em periódicos

1. **LEMOS, M.**; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOEING, T.; SOUSA, J. P. B. de; NANAYAKKARA, N. P. DHAMMIKA; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia., v.25, p.238 - 245, 2015.

2. MIRANDA, M. A.; **LEMOS, M.**; COWART, K. A.; RODENBURG, D.; MCCHESNEY, J. D.; RADWAN, M. M.; FURTADO, N. A. J. C.; BASTOS, J. K. Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell. Journal of Ethnopharmacology., v.172, p.421 - 429, 2015.

3. SANTIN, J. R.; **LEMOS, M.**; KLEIN-JUNIOR, L. C.; SILVEIRA, A. C. O.; PETREANU, M.; ZERMIANI, T.; BELLA-CRUZ, A.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Gastroprotective and anti-*Helicobacter pylori* effects of a flavonoid rich fraction obtained from *Achyrocline satureoides* (Lam) D.C.. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences., v.6, p.417 - 422, 2014.

4. KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SANTIN, J. R.; **LEMOS, M.**; SILVEIRA, A. C. O.; ROCHA, J. A. R.; BEBER, A. P.; WAGNER, T. H.; BRESOLIN, T. M. B.; BELLA-CRUZ, A.; CECHINEL-FILHO, V.; ANDRADE, S. F. Role of gastric mucus secretion, oxinitrergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). Journal of Pharmacy and Pharmacology., v.65, p.767 - 776, 2013.

5. GONÇALVES, A. L. M.; **LEMOS, M.**; NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; MAISTRO, E. L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. Journal of Ethnopharmacology., v.143, p.740 - 745, 2012.

6.1.3 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **LEMOS, M.**; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. Cytotoxic and apoptogenic properties of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer oleoresin and leaf extract on human gastric carcinoma cells In: 47th Annual Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics - SBFTE, 2015, Águas de Lindóia - SP. 47th Annual Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics - SBFTE. 2015.

2. SAMPAIO, B. L.; **LEMOS, M.**; MORAES, D. C.; FIGUEIREDO, S. A.; EDRADA-EBEL, R.; FONSECA, M. J. V.; COSTA, F. B. Evaluation of the antioxidant, photoprotective and photochemopreventive potential in vitro of *Tithonia diversifolia* extracts by an environmental metabolomics approach In: 5th Brazilian Conference on Natural Products, 2015, Atibaia - SP. 5th Brazilian Conference on Natural Products., 2015.

3. **LEMOS, M.**; MOTTA, E. V. S.; DA COSTA, J. C.; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. *In vivo* gastroprotective effects of the galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera* species on experimental gastric ulcer model In: 5th Brazilian Conference on Natural Products, 2015, Atibaia. 5th Brazilian Conference on Natural Products., 2015.

4. GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; BASTOS, J. K.; **LEMOS, M.**; POLIZELLO-JUNIOR, M.; ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. Modulatory effect of MMP-2 and MMP-9 in skin wounds treated with *Copaifera langsdorffii* Desf. Fabaceae. In: IV International Symposium on Drug Discovery, 2015, Araraquara. IV International Symposium on Drug Discovery., 2015.

5. GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; BASTOS, Jairo Kenupp; **LEMOS, M.**; POLIZELLO-JUNIOR, M.; ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. New topical formulation to skin wound healing using *Copaifera langsdorffii* In: 5th Brazilian Conference on Natural Products, 2015, Atibaia - SP. 5th Brazilian Conference on Natural Products., 2015.

6. **LEMOS, M.**; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Study of gastroprotective and healing activities of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer in vivo In: Phytopharm 2015, 2015, Bonn, Germany. Phytopharm 2015., 2015.

7. **LEMOS, M.**; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H. The gastroprotective effect of Copaifera spp.: Involvement of antioxidant activity of *C.*

oblongifolia Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer *in vitro* and *in vivo*. In: 37th All Ireland Schools of Pharmacy Conference 2015, 2015, Belfast, Northern Ireland. 37th All Ireland Schools of Pharmacy Conference 2015., 2015.

8. GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; BASTOS, J. K.; **LEMOS, M.**; POLIZELLO-JUNIOR, M.; PADOVANI, C. R.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. The comparative action of two vehicles of *Copaifera langsdorffii* leaves extract in skin wound healing. In: 14th International Congress of Ethnopharmacology, 2014, Puerto Varas, Chile. 14th International Congress of Ethnopharmacology., 2014.

9. **LEMOS, M.**; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; ANDRADE, S. F.; BASTOS, J. K. Comparative pharmacological studies of *Copaifera* spp.: gastroprotective, anti-inflammatory and antinociceptive properties of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer oleoresins and their hydroalcoholic leaves extracts. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, 2013, Natal - RN. 4th Brazilian Conference on Natural Products., 2013.

10. DA COSTA, J. C.; MOTTA, E. V. S.; **LEMOS, M.**; BASTOS, J. K. *Copaifera langsdorffii* aqueous extract and its galloylquinic acid display gastroprotective activity In: 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2013, Münster. Planta Medica., 2013. v.79. p.1189 - 1189

11. **LEMOS, M.**; MIZUNO, C. S.; SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, N. P. D.; ANDRADE, S. F.; BASTOS, J. K. *Copaifera langsdorffii* leaves extract and its isolated compounds display gastric ulcer activity In: 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2013, Münster. Planta Medica., 2013. v.79. p.1141 - 1142

12. MIRANDA, M. A.; **LEMOS, M.**; MCCHESNEY, J. D.; BASTOS, J. K. Gastroprotective activity of hydroethanolic extract from the leaves of *Solanum cernuum* Vell.. In: 40th Annual MALTO-Medicinal Chemistry - Pharmacognosy - Meeting-in-Miniature, 2013, Fayetteville - EUA. 40th Annual MALTO-Medicinal Chemistry - Pharmacognosy - Meeting-in-Miniature., 2013.

13. MOTTA, E. V. S.; DA COSTA, J. C.; **LEMOS, M.**; BASTOS, J. K. New methylated galloylquinic compounds isolated from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, 2013, Natal - RN. 4th Brazilian Conference on Natural Products., 2013.

14. **LEMOS, M.**; SANTIN, J. R.; OLIVEIRA, A. P.; KLEIN-JUNIOR, L. C.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Gastroprotective activity of the extract and fractions from leaves of “couve” (*Brassica oleracea* var *acephala* DC) in chronic ulcer model In: 5th International Symposium of Post Graduation and Research - V SINPOSPQ, 2012, Ribeirão Preto - SP. Revista Eletrônica de Farmácia., 2012. v.9.

6.1.4 Apresentação de trabalho e palestra

1. **LEMOS, M.**; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. Cytotoxic and apoptogenic properties of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer oleoresin and leaf extract on human gastric carcinoma cells, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)

2. **LEMOS, M.**; MOTTA, E. V. S.; DA COSTA, J. C.; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. *In vivo* gastroprotective effects of the galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera* species on experimental gastric ulcer model, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)

3. **LEMOS, M.**; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; ANDRADE, S. F.; BASTOS, J. K. Comparative pharmacological studies of *Copaifera* spp.: gastroprotective, anti-inflammatory and antinociceptive properties of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer oleoresins and their hydroalcoholic leaves extracts., 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. **LEMOS, M.** Modelos farmacológicos para avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e gastroprotetora de produtos naturais e sintéticos, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

5. **LEMOS, M.**; SANTIN, J. R.; OLIVEIRA, A. P.; KLEIN-JUNIOR, L. C.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Gastroprotective activity of the extract and fractions from leaves of 'couve' (*Brassica oleoracea* var *acephala* DC) in chronic ulcer model, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

6.1.5 Orientações e supervisões concluídas: co-orientador

1. Guilherme Venâncio Símaro. Avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória da oleorresina de *Copaifera pubiflora* Benth. 2016. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências - Universidade de Franca) - Universidade de Franca

6.1.6 Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **37th All Ireland Schools of Pharmacy Conference 2015**, 2015. (Encontro)

> The gastroprotective effect of *Copaifera* spp.: Involvement of antioxidant activity of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer *in vitro* and *in vivo*.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **47th Annual Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics - SBFTE**, 2015. (Outra)

Cytotoxic and apoptogenic properties of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer oleoresin and leaf extract on human gastric carcinoma cells.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **5th Brazilian Conference on Natural Products**, 2015. (Outra)

In vivo gastroprotective effects of the galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera* species on experimental gastric ulcer model.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Workshop do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, 2015. (Outra)

Estudo fitoquímico e farmacológico de espécies de *Copaifera*: *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Workshop do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, 2014. (Outra)

Estudo fitoquímico e farmacológico de espécies de *Copaifera*: *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **4th Brazilian Conference on Natural Products**, 2013. (Congresso)

Comparative pharmacological studies of *Copaifera* spp.: gastroprotective, anti-inflammatory and antinociceptive properties of *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne and *C. duckei* Dwyer oleoresins and their hydroalcoholic leaves extracts.

7. **5th Phytpharmatech - International Sympoium on Phytopharmaceutical Tecnology**, 2013. (Simpósio).

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Workshop do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, 2013. (Outra)

Estudo fitoquímico e farmacológico de espécies de *Copaifera*: *C. oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer.

9. Conferencista no(a) **Seminários em Introdução a Biotecnologia**, 2013. (Seminário)

Modelos farmacológicos para avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e gastroprotetora de produtos naturais e sintéticos.

10. Avaliador no(a) **20º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2012. (Simpósio)

Efeito protetor de compostos fenólicos de Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) sobre o estresse oxidativo induzido por H2O2 em células beta pancreáticas.

11. Avaliador no(a) **20º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2012. (Simpósio)

Avaliação da atividade antiúlcera de nanopartículas contendo *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims.

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **5th International Symposium of Post Graduation and Research - V SINPOSPQ**, 2012. (Simpósio)

Gastroprotective activity of the extract and fractions from leaves of “couve” (*Brassica oleracea* var *acephala* DC) in chronic ulcer model.