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- κ B.

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 auxiliaram 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 estudadas 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 citoprotetores 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 $INF-\gamma$, $IL-1\beta$, $IL-6$ e $TNF-\alpha$. 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- κ B 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- κ B 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, tornando 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 an 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 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-1 β , 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 interfere with NF- κ B 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- κ B 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 caurenóico, 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%/0,03N) 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 glutatona 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 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 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 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/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-1β (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* 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/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-10 (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* 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/mL de 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 <i>C. oblongifolia</i>	101
Tabela 4. Rendimentos das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. duckei</i>	101
Tabela 5. Composição química da oleorresina de <i>C. oblongifolia</i> no método A.....	102
Tabela 6. Composição química da oleorresina de <i>C. duckei</i> no método A.....	103
Tabela 7. Composição química da oleorresina de <i>C. duckei</i> no método B.....	103
Tabela 8. Composição química das oleorresinas e extratos das folhas de <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> 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 citotóxica 20% (CC ₂₀), 50% (CC ₅₀) e 80% (CC ₈₀) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , do ácido poliáltico 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 citotóxica 20% (CC ₂₀), 50% (CC ₅₀) e 80% (CC ₈₀) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> (2000 mg/kg) e <i>C. duckei</i> (1000 mg/kg).....	134
Tabela 23. Valores de concentração citotóxica 20% (CC ₂₀), 50% (CC ₅₀) e 80% (CC ₈₀) para a oleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> , 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 citotóxica 20% (CC ₂₀), 50% (CC ₅₀) e 80% (CC ₈₀) para o ácido gálico, ácido quínico, os 16 ácidos galoíluínicos derivados de <i>Copaifera</i> 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e de <i>C. duckei</i> (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 <i>Copaifera</i> 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> sobre a bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	162
Tabela 36. Resultados da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima das frações do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. oblongifolia</i> sobre a bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	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 <i>C. oblongifolia</i> (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) com co-infecção por <i>Helicobacter pylori</i> 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> (300 mg/kg) em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético (20 µL, 20%) com co-infecção por <i>Helicobacter pylori</i> 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 <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> 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 hidroalcoólicos das folhas de <i>C. oblongifolia</i> e <i>C. duckei</i> 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 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 citotóxica 20% (CC₂₀), 50% (CC₅₀) e 80% (CC₈₀) 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 citotóxica 20% (CC₂₀), 50% (CC₅₀) e 80% (CC₈₀) 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: $\%ALtratado$: 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]⁺	<i>positive ion mode</i> ; modo positivo
[M-H]⁻	<i>negative ion mode</i> ; modo negativo
5-HT	serotonina
5-HT₃	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 <i>Homo sapiens</i> , adenocarcinoma gástrico – ATCC® CRL-1739®
AINEs	anti-inflamatório não esteroide
ALT	alanina aminotransferase
AMP	monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
AP-1	<i>activator protein 1</i> ; proteína ativadora tipo 1
APC	<i>antigen presenting cells</i> ; células apresentadoras de antígenos
ASIC	acid-sensing ion channels; canais iônicos sensíveis a ácido
AST	aspartato aminotransferase
ATC	ácido tricloroacético
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
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	<i>B-cell-activating factor</i> ; fator ativador de células B
Balb/C	camundongos (<i>Mus musculus</i>) albinos linhagem Balb/c
BASO	basófilos
BK	bradicinina
C57BL06	camundongos (<i>Mus musculus</i>) black linhagem C57BL06
Ca²⁺	Íons cálcio

CAT	catalase
CBM	concentração bactericida mínima
CC	concentração citotóxica
CCK-2	Colecistoquinina tipo B
CD14	cluster de diferenciação 14; <i>cluster of differentiation 14</i>
CD4+	linfócito T auxiliar
CD8+	linfócito T citotóxico
CD40	cluster de diferenciação 40; <i>cluster of differentiation 40</i>
CD80	cluster de diferenciação 80; <i>cluster of differentiation 80</i>
CD86	cluster de diferenciação 86; <i>cluster of differentiation 86</i>
CE	concentração efetiva
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i> ; Adjuvante Completo de Freund
CGRP	gene da calcitonina
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CHO-k1	linhagem celular derivada de <i>Cricetulus griseus</i> , 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	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CO₂	dióxido de carbono
COX-1	ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2	ciclo-oxigenase tipo 1
CREB1	<i>cAMP-response element-binding protein-1</i>
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
CYP₄₅₀	citocromo P450
DAG	diacilglicerol
DI	dose inibitória
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido

DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; ácido desoxirribonucleico
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> ; 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DTNB	<i>5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i> ; ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico; Reagente de Ellman
E.P.M.	erro padrão da média
ECD	extrato de <i>C. duckei</i>
ECO	extrato de <i>C. oblongifolia</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético; <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EI	<i>electron ionization</i> ; ionização por impacto de elétrons
EOS	eosinófilos
EP	<i>prostaglandin receptor</i> ; receptor de prostaglandina
EtOH/HCl	solução etanol a 60 % com HCl 0,3 N
Fe²⁺	íon ferro
gamma-GT ou γ-GT	gamma-glutamyltransferase
Gi	proteína G inibitória
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GST	glutathione-S-transferase (),
H⁺	íon hidrogênio
H⁺, K⁺-ATPase	enzima hidrogênio-potássio-ATPase; bomba de prótons
H₁	receptor de histamina do tipo 1
H₂	receptor de histamina do tipo 2
H₂CO₃	ácido carbônico
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
H₃PO₄	ácido Fosfórico
HAM-F12	<i>Ham's F-12 Nutrient Mixtures</i>
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCO₃	bicarbonato
HCO₃⁻	íon bicarbonato
HCT	hematócrito
HeLa	linhagem celular derivada de <i>Homo sapiens</i> , carcinoma de colo de útero – ATCC® CCL2®

HGB	hemoglobina
HO[•]	radical hidroxila
HOCl	ácido hipocloroso
I.A.S.P.	<i>International Association for the Study of Pain</i>
i.p.	via intra-peritonal
i.pl.	via intra-plantar
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> ; molécula de adesão intercelular-1
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IL	Interleucina; <i>interleukin</i>
IL-1	interleucina 1; <i>interleukin 1</i>
IL-10	interleucina 10; <i>interleukin 10</i>
IL-12	interleucina 12; <i>interleukin 12</i>
IL-13	interleucina 13; <i>interleukin 13</i>
IL-16	interleucina 16; <i>interleukin 16</i>
IL-18	interleucina 18; <i>interleukin 18</i>
IL-1β	interleucina 1 beta; <i>interleukin 1 beta</i>
IL-2	interleucina 2; <i>interleukin 2</i>
IL-4	interleucina 4; <i>interleukin 4</i>
IL-5	interleucina 5; <i>interleukin 5</i>
IL-6	interleucina 6; <i>interleukin 6</i>
IL-8	interleucina 8; <i>interleukin 8</i>
INF	interferon
INF-α	interferon alfa
INF-β	interferon beta
INF-γ	interferon gamma
IP₃	trifosfato inositol
IRF3	<i>interferon-regulatory fator 3</i> ; fator regulador 3 do IFN
IRFs,	interferons
IκB	proteína inibitória kappa B
K⁺	íon potássio
KC	quimiocina KC

KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato monopotássico; hidrogenofosfato de potássio
L929	linhagem celular derivada de <i>Mus musculus</i> , tecido conjuntivo subcutâneo; areolar e adiposo - fibroblasto, NCTC clone 929 [L cell, L-929, <i>derivative of Strain L</i>] – ATCC® CCL-1®,
LBP	proteínas ligante de LPS; <i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
LIN	linfócitos
L-NAME	L-metil-arginina-éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LTα	linfotóxina α
M100-S16	suplemento do M7-A7
M₃	receptor muscarínico tipo 3
M7-A7	<i>Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i> - proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> ; 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
MgCl₂	cloreto de magnésio
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; complexo principal de histocompatibilidade
MONO	monócitos
MPO	mieloperoxidase; peróxido de hidrogênio oxidoreductase
Na⁺	íon sódio
Na⁺, K⁺ ATPase	enzima sódio-potássio-ATPase
Na₂HPO₄	fosfato dissódico; hidrogenofosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
NEU	neutrófilos
NF-κB	fator nuclear kappa B; <i>factor nuclear kappa B</i>
NFκB1	fator nuclear kappa B tipo 1; <i>factor nuclear kappa B1</i>

NFκB2	fator nuclear kappa B tipo 2; <i>factor nuclear kappa B2</i>
NGF	<i>nerve growth fator</i> ; fator do crescimento do nervo
NLS	<i>nuclear localization signals</i> ; sinal de localização nuclear
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO	óxido nítrico
NOSi	enzima sintase de óxido induzível
O₂	oxigênio
O₂^{•-}	ânion superóxido
OCD	oleorresina de <i>C. duckei</i>
OCO	oleorresina de <i>C. oblongifolia</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P2X3	receptor purinérgico
PAF	fator de agregação plaquetária
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; tampão fosfato salino
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> ; molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	prostaciclina
PGN	peptídeoglicano
PGs	prostaglandinas
pH	escala para medida do potencial hidrogeniônico
PI	iodeto de propídio
Pi	fósforo inorgânico
PLA2	fosfolipase A2
PLA₂	enzima fosfolipase A ₂
PLT	número total de plaquetas
pNF-κB-Luc	gene repórter luciferase em resposta a expressão de NF-κB;
PSA	<i>penicillin-streptomycin-amphotericin B</i> ; penicilina/estreptomicina/anfotericina
®	registrado; marca registrada
RAW 264.7-Luc	linhagem celular derivada de <i>Mus musculus</i> , macrófago proveniente de tumor de Abelson induzido por vírus, geneticamente modificado – ATCC® TIB-71®
RBC	<i>red blood cells</i> ; número total de hemácias

RDW	<i>red cell distribution</i>
RNA_m	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; ácido ribonucleico mensageiro
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
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	<i>signal transducer and activator of transcription</i> ; transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TBA	<i>2-thiobarbituric acid</i> ; ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> ; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Th0	células T <i>helper</i> em repouso
Th1	células T <i>helper</i> tipo 1
Th2	células T <i>helper</i> tipo 2
THP-1	linhagem celular derivada de <i>Homo sapiens</i> , monócitos de sangue periférico de leucemia monocítica aguda – ATCC® TIB-202®
TLR	receptor <i>Toll-like</i>
TLR2	receptor <i>Toll-like</i> tipo 2
TLR4	receptor <i>Toll-like</i> tipo 4
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa; <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNT	<i>Tris-HCl-Tween buffer</i> ; tampão Tris-HCl-Tween
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TRPV	<i>transient receptor potential cation channels</i> ; receptor vaniloide
TRPV1	<i>transient receptor potential cation channels type 1</i> ; receptor vaniloide tipo 1
TSA	<i>trypticase soy agar</i> ; ágar triptona de soja
TSB	<i>trypticase soy broth</i> ; 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	<i>white blood cells</i> ; 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 <i>Copaifera</i>	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 <i>Copaifera</i>	56
4.1.1 <i>Preparo dos extratos brutos das folhas</i>	57
4.1.2 <i>Preparo das partições a partir do extrato bruto hidroalcoólico das folhas</i>	57
4.2 Análises cromatográficas	59
4.2.1 <i>Análise da composição das oleorresinas de C. oblongifolia e C. duckei por CG-EM</i>	59
4.2.2 <i>Análise qualitativa (desreplicação) das oleorresinas, extratos e partições das</i> <i>folhas de C. oblongifolia e C. duckei</i>	59
4.3 Ensaio toxicológicos e farmacológicos.....	63
4.3.1 <i>Delineamento experimental</i>	63
4.3.2 <i>Manutenção das linhagens celulares</i>	64

4.3.3	<i>Animais</i>	65
4.4	Avaliação da atividade toxicológica	66
4.4.1	<i>Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada CHO-k1 e L929</i>	66
4.4.2	<i>Avaliação da toxicidade aguda dose única in vivo – 14 dias e avaliação da toxicidade sub-crônica doses repetidas in vivo – 90 dias</i>	67
4.5	Avaliação da atividade gastroprotetora.....	69
4.5.1	<i>Avaliação da atividade gastroprotetora in vitro</i>	69
4.5.2	<i>Avaliação da atividade gastroproterora sob úlceras agudas</i>	71
4.5.3	<i>Avaliação da atividade gastroproterora sob úlceras crônicas</i>	72
4.5.4	<i>Avaliação da atividade sobre a secreção gástrica</i>	74
4.5.5	<i>Atividade anti-Helicobacter pylori</i>	76
4.5.6	<i>Mecanismos de ação gastroprotetora antioxidante in vitro</i>	78
4.5.7	<i>Inibição da óxido nítrico sintase (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) in vivo</i>	81
4.5.8	<i>Determinação da atividade da Glutathione S- Transferase (GST), Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA) na Região Glandular Gástrica</i>	81
4.5.9	<i>Mecanismos de ação gastroprotetora anti-inflamatória</i>	83
4.5.10	<i>Mecanismos de ação gastroprotetora anti-secretória</i>	84
4.6	Avaliação da atividade antinociceptiva	85
4.6.1	<i>Avaliação da atividade sob o sistema nervoso central</i>	85
4.6.2	<i>Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória</i>	87
4.6.3	<i>Modelos de nocicepção aguda</i>	87
4.6.4	<i>Modelos de hiperalgesia</i>	88
4.6.5	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória</i>	92
4.7	Análise Estatística	98
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.1	Rendimento das coletas da oleorresina das espécies de <i>Copaifera</i> spp.	100
5.2	Rendimento dos extratos hidroalcoólicos e partições das espécies de <i>Copaifera</i> spp.	100

5.2.1	<i>Análise da composição das oleorresinas de C. oblongifolia e C. duckei por CG-EM</i>	101
5.2.2	<i>Análise qualitativa (desreplicação) das oleorresinas, extratos e partições das folhas de C. oblongifolia e C. duckei</i>	104
5.3	<i>Avaliação da atividade toxicológica</i>	111
5.3.1	<i>Efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares CHO-k1 e L929</i>	111
5.3.2	<i>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</i>	118
5.4	<i>Avaliação da atividade gastroprotetora</i>	135
5.4.1	<i>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</i>	135
5.4.2	<i>Efeitos gastroprotetores das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. úlceras agudas</i>	145
5.4.3	<i>Efeitos gastroprotetores das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera spp. úlceras crônicas</i>	155
5.4.4	<i>Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de Copaifera sobre a secreção gástrica e a quantidade de muco gástrico (ligadura de piloro)</i>	159
5.5	<i>Avaliação da atividade anti-Helicobacter pylori</i>	161
5.5.1	<i>Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bacteriana mínima (CBM)</i>	161
5.5.2	<i>Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre animais infectados por Helicobacter pylori submetidos à úlceras crônicas por ácido acético</i>	162
5.5.3	<i>Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade antioxidante in vitro</i>	164
5.5.4	<i>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</i>	167
5.5.5	<i>Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade da glutatona S- transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e níveis de óxido nítrico (NO) na região glandular gástrica</i>	170
5.5.6	<i>Efeitos das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na região glandular gástrica</i>	173
5.5.7	<i>Efeito das oleorresinas e extratos das folhas de Copaifera spp. sobre a atividade da enzima H^+, K^+-ATPase</i>	175
5.6	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva</i>	180

5.6.1	<i>Efeito das oleorresinas, extratos das folhas de <i>Copaifera</i> spp. e do ácido poliáltico sobre atividade sob o sistema nervoso central.....</i>	180
5.6.2	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre contorções abdominais</i>	183
5.6.3	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre a nocicepção espontânea produzida por formalina</i>	187
5.6.4	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre a nocicepção térmica através do teste de retirada da cauda (Tail-Flick)</i>	193
5.6.5	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia mecânica</i>	196
5.6.6	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia mecânica associada à avulsão de plexo braquial (APB).....</i>	214
5.6.7	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre o edema de pata....</i>	221
5.6.8	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico no exudato da bolsa de ar (Air pouch)</i>	232
5.6.9	<i>Efeito da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre a hiperalgesia inflamatória induzida CFA.....</i>	243
5.6.10	<i>Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de <i>Copaifera</i> spp. sobre células THP-1</i>	248
5.6.11	<i>Efeitos das oleorresinas, extratos das folhas e substâncias isoladas de <i>Copaifera</i> 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</i>	252
5.6.12	<i>Efeitos da oleorresina de <i>C. duckei</i> e do ácido poliáltico sobre atividade específica sobre NF-κB em macrófagos RAW-264.7-Luc</i>	264
6	CONCLUSÃO.....	270
	REFERÊNCIAS	277
	ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO PARA A COLETA DA <i>C. OBLONGIFOLIA</i> .	329
	ANEXO II - TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA BIOPROSPECÇÃO DO SISBIO/IBAMA330	
	ANEXO III - TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA ENSAIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	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’óleo” (**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-1 β , 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 (KWIECIENÍ 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 glutational. 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; KWIECIENÍ; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002).

Além da inibição do potencial oxidativo, as células epiteliais secretam prostaciclina (PGI₂) e, principalmente, a prostaglandina E₂ (PGE₂), 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, conseqüentemente 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 (MCDUGALL, 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 (19° 56.833'S 48° 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 (19° 56.833'S 48° 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 °C (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, diclorometano, 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 60°C; temperatura de injeção de 250°C; modo de injeção *Split* (1:90); vazão na coluna de 1,30 mL/min; gás de arraste – nitrogênio (N₂); rampa de aquecimento de 60 à 240°C (método A) (ADAMS, 2007) e 60 à 300°C (método **B**); taxa de aquecimento – 3°C/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 de bombas modelo Accela 1250 pump, acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo Accela PDA detector 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 – 300°C; modo negativo – 320°C). 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 40°C.

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

Tempo (minutos)	Proporção de solventes	
	A (%)	B (%)
Ascentis Express C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm)		
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 25°C.

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

Tempo (minutos)	Proporção de solventes	
	A (%)	B (%)
Coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm)		
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 estendida; altura mínima do pico – 5×10^5 ; 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://dnpc.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 CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (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 cm² com volume de 50 mL ou de 75 cm² 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 μ L 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 $\pm$ 5g), camundongos *Balb/C* e *C57BL06* (*Mus musculus*) machos (20 $\pm$ 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 $\pm$ 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 $\pm$ 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 °C), 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 Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada CHO-k1 e L929

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 5×10^4 células/mL foram acondicionadas em placas de 96 poços. Após vinte e quatro horas, as células foram tratadas com oleoresina 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 °C, 5% de CO₂ 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 °C, 5% de CO₂ 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 polilático 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 14º dia, para o teste agudo e até o 90º 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. Cláudia 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-glutamilttransferase (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) *Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada AGS*

Alíquotas de 200 μL /poço da suspensão celular contendo 5×10^4 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 °C, 5% de CO₂ 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 °C, 5% de CO₂ 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-100, 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 sigmoideal 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 50×10^4 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 °C, 5% de CO₂ 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 50×10^4 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 gastroprotetora 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 contendo 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 mm² 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 caurenóico, ácido polialtico, 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 (mm²), 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 microscópio 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 °C) 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% CO₂ 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 $1,5 \times 10^8$ 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 ($1,5 \times 10^7$ 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 $2,5 \times 10^6$ 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 $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, obtendo-se uma concentração final de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($2,5 \times 10^5$ 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 37°C 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% (EC₅₀) utilizando uma curva hiperbólica. A determinação do CE₅₀ é um parâmetro muito utilizado para medir a atividade antioxidante (PAREJO et al., 2000) sendo que quanto menor o CE₅₀ maior é a atividade antioxidante.

a) *Determinação da atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•]*

A atividade antioxidante foi avaliada pela diminuição da absorvância da solução metanólica do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O método do DPPH[•] é baseado na redução do radical DPPH[•] a DPPH-H que leva a alteração colorimétrica (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Moléculas doadoras de íons hidrogênio (H[•]), 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 CE₅₀.

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 xantina 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 100°C (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 37°C 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 95°C 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 glutathione 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, Na₂HPO₄ 81 mM e KH₂PO₄ 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 (A₁). 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 (A₂), a 412 nm, em 15 minutos de reação, para determinação de grupamentos sulfidrila não protéico (GSH). A concentração de grupamento sulfidrila (tiol) é dada por (A₁ – A₂) x 1,57, em curva padrão de glutathione. 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 μ L da amostra. Em espectrofotômetro foi realizada a leitura do decaimento a cada 60 segundos durante 10 min. A atividade da catalase foi calculada como μ mol 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 μ mol 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 μ L 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 μ M 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 μ L das amostras, adicionando-se 200 μ L 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 ressuspenso 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 polilático (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 polilático (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); oleoresina 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 μ mol/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 poliáltico (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 flogísticos:

1. carragenina 15 mg/mL (20 μ L/300 μ g/pata) (JENSEN et al., 1986; VIVANCOS et al., 2004; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962);
2. dextrana 5 mg/mL (20 μ L/100 μ g/pata) (JORI; BENTIVOGLIO; GARATFINI, 1961; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982; SHINICHI; KYOICHI; SETSUO, 1978, 1979);
3. lipopolissacarídeo (LPS) 5 μ g/mL (20 μ L/100 ng/pata) (CUNHA et al., 2008; VAJJA et al., 2004) e;
4. zymosan 5 mg/mL (20 μ L/100 μ g/pata) (AOYAMA et al., 1984; TARAYRE et al., 1989).

Na pata contralateral foram administrados 20 μ L 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 μ L/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 μ m, 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); cremofores 10 % (v.o.; controle negativo); oleoresina 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 mieloperoxidase.

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 aliqüotados 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 poliático, 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) *Citotoxicidade em linhagem celular imortalizada THP-1*

Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão celular contendo 15×10^4 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 poliático, 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 °C, 5% de CO₂ 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 μ L de PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 h a 37 °C, 5% de CO₂ 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-100, pH 5,5. Após a etapa de incubação adicionou-se 50 μ L 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 sigmoideal 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 μ L/poço da suspensão celular contendo 285×10^4 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 μ L/mL de meio (6 μ L/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 μ g/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 μ M/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 °C, 5% de CO₂ 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-1 β), 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 μ L/poço da suspensão celular contendo 285×10^4 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 μ L/mL de meio (6 μ L/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 μ g/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 μ M/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 μ g/mL (SCHILDBERGER et al., 2013; SONG; PHELPS, 2000). As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 h e 72h. O sobrenadante (alíquotas de 60 μ L) foi coletado para dosagem de interferon gamma (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β), 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- κ B 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- κ B, 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- κ B (pNF- κ B-Luc) (WANG et al., 2014). Em primeiro momento, foi determinada a citotoxicidade em linhagem celular imortalizada RAW-264.7-Luc. Alíquotas de 200 μ L/poço da suspensão celular contendo 1×10^5 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 μ g/poço, ácido poliáltico nas concentrações de 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, e 30,0 μ M/poço, além do controle do solvente (DMSO 2%) e o

controle negativo (meio). Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ 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 °C, 5% de CO₂ 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-100, 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 sigmoideal 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 10⁵ células/mL (2 x 10⁵ 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 °C, 5% de CO₂. 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 µL de tampão de lise celular, TNT contendo de Tris-HCl 10 mM a pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, e Triton a 1%, durante 5 min a 4°C. 10 µL desta solução foi alíquotada 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 luminômetro 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- κ B (PINHO-RIBEIRO et al., 2016).

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos em média $\pm$ 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% (DI₅₀) 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).

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 *Copaifera* 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 *Copaifera* 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 citoprotetores 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)-quínicos (**11**), ácido 4-O-(galoil)-5-O-(galoil 3-O-metil)-quínicos (**12**) e o ácido 4,5-di-O-galoilquínicos (**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 opídeos, 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 poliáltico 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 diminuição da concentração de NF κ B 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 NF κ B.

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 TNF α e na via de sinalização do NF κ B, 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-inflamatórios 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.; EMMANOULIDES, 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 multifaceted 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 *Zanthoxylum 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.; GROTTIELLI, S.; MARCOTULLIO, M. C.; MESSINA, F.; ROSCINI, L.; CARDINALI, G.; CURINI, M.; MINELLI, A. Furanodien-6-one from *Commiphora erythraea* inhibits the NF-κB 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. Ministério 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.; ÜNLÜÇERÇİ, 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: modulação 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. Ministério 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 Básica 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.; ŞAHİN, 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 & Immunology**, 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, USA Waters 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- κ B — 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- κ B. **Journal of Natural Products**, p. acs.jnatprod.6b00263, 2016.

FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBAS-PÉCLAT, V.; BUSO, 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.; PIAULINO, 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, USA GraphPad 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.; PICCOLO, G.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V. O.; CURY, Y. Crotalpine 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 Psychology, University of California**, v. 6, p. 1–12, 1932.

HANINEC, P.; SÁMAL, F.; TOMÁS, R.; HOUSTAVA, L.; DUBOVÝ, 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-3 β 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.; ACHOU, 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, oxinitergic 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 pentoxifylline 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.

LE MOS, 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 TNF α -induced NF- κ B 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-Fluorophenyl)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. **Química 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. NF κ B: 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.; SCHOPHOL, 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. **Química 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- γ . **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 materials **Lloydia**, 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 erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 25 nov. 1969.

MCDUGALL, 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 theory** Science, 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 proapoptotic 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 rats** *Physiological 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, USA John 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. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.

MSD. **Meso Scale Discovery** Gaithersburg, MD Meso 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.; BELLOWES, 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 oligodendroglionopathy. **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.; ÇAKIR, 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 Rodents** OECD 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>> http://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, USA OriginLab 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 langsdorffii* 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-1 β 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.; TERCENIO, 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.; HENRIKSÄS, 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- κ B 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. **Química 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.; FRIDERICH, 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. Antiinflammatory 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.

RUSO, 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-κB 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-1β-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. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 32, n. 4, p. 294–306, 2009.

SANDVIK, A. K.; BRENNAN, 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 National 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 satureioides* (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- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, 2002.

SHAY, H.; KOMAROV, S.; FELLS, 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.; MARCUSSEON-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.

SOUZA, 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.; AMBRÓSIO, 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.; UGREŠIĆ, 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. **Química 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.; HOBBERMAN, 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.; BOSCA, L. Anti-inflammatory actions of acanthoic acid-related diterpenes involve activation of the PI3K p110 γ/δ subunits and inhibition of NF- κ B. **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. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612–615, 1997.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química 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.; CHARLOT, A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B 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 Veterinária 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 Schmerzsinns. Zweite Mittheilung. **Ber. Sächs. Ges. Wiss. Leipzig Math.-Phys. Kl.**, v. 46, p. 283–296, 1894a.

VON FREY, M. Beiträge zur Physiologie der Schmerzsinns. **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. Untersuchungen über 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 antiinflammatory 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. I κ B kinases: Key regulators of the NF- κ B 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. **Química 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.

LEMOS, M. _____

Referências

ZANBOORI, A.; TAMADDONFARD, E.; MOJTAHEDEIN, A. **Effects of chlorpheniramine and ranitidine on the visceral nociception induced by acetic acid in rats: Role of opioid system** *Pakistan 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*

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 óleos-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

Arthur Borges Jacob
Analista Ambiental
USA – Usina Santo Ângelo Ltda

LE MOS, M.

Anexos

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 de IN 154/2007, 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 e 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	CNPJ: 508.489.252-20
Título do Projeto: VALIDAÇÃO QUÍMICA-FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.749/0001-23

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Primeira coleta das oito espécies de copelba selecionadas em campo (ano 2012)	07/2012	06/2012
2	Segunda coleta das oito espécies de copelba selecionadas em campo (ano 2013)	07/2013	06/2013
3	Terceira coleta das oito espécies de copelba selecionadas em campo (ano 2014)	07/2014	06/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo deverão ser realizadas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, 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 de cultura nativa e cultura popular, presente e passado, 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 exclui 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), de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor 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 13/2010, 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 (Sisbio 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 condições in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando de 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/gen .
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 de Ciência e Tecnologia.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CNPJ	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jonas Joaquim Menezes da Silva	Colaborador	702.676.182-04	4179881 SSP-PA	Brasileira
2	Jairo Kenupp Bastos	Coordenador Geral do Projeto	564.337.947-34	04081404-3 IFF-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PARAUPEBAS	PA	FLORÉSTIA 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).

Código de autenticação: 22587916

Página 1/3

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: 09/06/2013 15:58	Data para Revalidação*: 08/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, 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 e 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 QUÍMICA-FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.746/0001-23

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*	Qtd.	Tipo de amostra	Qtd.	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).

Código de autenticação: 22587916

Página 3/3

ANEXO III - Termo de autorização para ensaios farmacológicos *in vivo*

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

ANEXO IV – Trabalhos publicados e submetidos durante o período do doutorado**6.1 Produção bibliográfica****6.1.1 Artigos completos submetidos para publicação**

1. **LEMONS, 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.; **LEMONS, 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.; **LEMONS, 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. **LEMONS, 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.; **LEMONS, M.**; COWART, K. A.; RODENBURG, D.; MCCHESENEY, 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.; **LEMONS, 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 satureioides* (Lam) D.C.. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences., v.6, p.417 - 422, 2014.

4. KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SANTIN, J. R.; **LEMONS, 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.

LEMOS, M.

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.*

LEMOS, M.

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.**; MCCHESENEY, 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. **LE MOS, 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. **LE MOS, 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. **LE MOS, 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. **LE MOS, 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. **LE MOS, 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, 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 / Paineis 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 / Paineis 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 / Paineis 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 / Paineis 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 Phytopharmatech - International Symposium on Phytopharmaceutical Technology**, 2013. (Simpósio).

8. Apresentação de Poster / Paineis 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.