



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO DE RISCO (TOXICIDADE/ALERGENICIDADE) DE
PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* COMO INSUMO TERAPEUTICO**

FORTALEZA

2025

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

DETERMINAÇÃO DE RISCO (TOXICIDADE/ALERGENICIDADE) DE PROTEÍNAS
DO LÁTEX DE *Calotropis procera* COMO INSUMO TERAPEUTICO

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A449d Almeida, Marina Gabrielle Guimarães.

Determinação de risco (toxicidade/alergenicidade) de proteínas do látex de *Calotropis procera* como insumo terapêutico / Marina Gabrielle Guimarães Almeida. – 2025.
85 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

1. Alergia. 2. Biomembrana. 3. Digestibilidade. 4. Histopatologia. 5. Teste de Contato. I. Título.

CDD 572

MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE ALMEIDA

DETERMINAÇÃO DE RISCO (TOXICIDADE/ALERGENICIDADE) DE PROTEÍNAS
DO LÁTEX DE *Calotropis procera* COMO INSUMO TERAPEUTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Ceará como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora
em Bioquímica. Área de concentração:
Bioquímica Vegetal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos. (Orientador)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Prof. Dr. Hermogenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Prof. Dr. Tamiris de Fatima Goebel de Souza
Universidade Federal do Ceara (UFC)

A Deus.

Ao meu esposo, aos meus filhos, aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por me conceder saúde e força para encarar os desafios diários e à Virgem Maria Santíssima por sempre interceder por mim.

À Universidade Federal do Ceará - UFC pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela contribuição para melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao professor Dr. Márcio Viana Ramos por ter me recebido em seu laboratório, confiado a mim um de seus projetos e por me orientar na realização deste trabalho.

À professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar por ter me acolhido em seu laboratório juntamente com a equipe de alunos e colaboradores, em especial à doutoranda Marília Oliveira que me auxiliou na execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Hermógenes David de Oliveira pelos ensinamentos e palavras de incentivo, por me acolher em seu laboratório e pela ajuda da estudante Vilmara Farias que me auxiliou neste trabalho.

Ao professor Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira pela parceria nas análises hematológicas.

À Dr. Denise Nunes Oliveira e à Vlândia Dias pelas análises de histopatologia.

À Dr. Gabriela Farias, do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, pelo suporte e treinamento com os animais de laboratório.

À Dr. Maria Araci Pontes Aires pela disponibilidade.

A Dr. Ayrles Fernanda Brandão da Silva, pela ajuda, pelos bons conselhos, orientações e principalmente pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia do Látex Vegetal (BioLatex), que estiveram ao meu lado nessa jornada, pelo apoio e ajuda nas incansáveis coletas de látex. Em especial, ao meu amigo Brandon Ferraz, pelas contribuições científicas na bancada, construção deste trabalho e por sempre está disposto a me ajudar.

À todos os voluntários que participaram deste trabalho, pelo comprometimento de cada encontro, pela paciência e pela contribuição à pesquisa brasileira.

Aos meus amigos de graduação Camila Tauane, Roberta Laiz, Roberta Cristiane e Acrísio Bastos (*in memoriam*) pelos momentos de descontração, alegrias, superações e pelo companheirismo de todos esses anos juntos.

A minha mãe Angelina Maria que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, me deu ânimo nos momentos difíceis e me ensinou o caminho da fé e oração, obrigada pelo seu amor incondicional.

Ao meu pai Marcos Antônio (*in memoriam*) por ter sempre acreditado em mim, pelo incentivo e investimento nos meus estudos, por ter sido um exemplo de pai, de amigo e de cristão. Para sempre estará em meu coração.

Aos meus avós Severino Severo e Maria Inocência por serem exemplos de comunidade, fraternidade e família.

À minhas irmãs Lívia Karoline e Aline Angélica por terem sido minhas referências de perseverança nos estudos e por sempre estarem ao meu lado. Ao meu afilhado Felipe Neto e aos meus sobrinhos Marcos Neto e Heitor por me mostrarem o quão preciosa é nossa família.

Aos meus queridos cunhados Felipe Júnior, Victor Jorge e Naynara Silveira por todo apoio e carinho. Aos meus sogros Laelma Silveira e Pedro Paulo por todo suporte e amor.

Em especial agradeço ao meu esposo Eduardo Silveira pela paciência, pela cumplicidade, pelo apoio que me deu em todas minhas decisões, pelo incentivo no meu crescimento pessoal e profissional. Ao meu pequeno Eduardo Júnior que faz minha vida ser repleta de amor com seus gestos inocentes e sorriso cativante. Sou muito feliz e grata pela família que estamos construindo, amo vocês.

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência.” (Santo Agostinho).

RESUMO

Calotropis procera é uma planta laticífera da família Apocynaceae, originária na Índia, muito utilizada na medicina tradicional. Foram relatadas diversas propriedades farmacológicas das proteínas solúveis do látex (PL) desta espécie, como atividades anti-inflamatórias, analgésica, antitumoral, anticancer, anti-hiperglicêmica, antioxidante, entre outros. Recentemente, as PL foram utilizadas no desenvolvimento de um coalho para a produção de queijo e no desenvolvimento de uma biomembrana à base de álcool polivinílico (PVA) para cicatrização de feridas testadas em modelo animal. Apesar dos estudos realizados a respeito do potencial para aplicação de PL como fitoterápico e da segurança já relatada destas proteínas, o presente estudo tem como objetivo aprimorar a avaliação das propriedades toxicológicas e alergênicas, bem como obter um melhor entendimento da segurança de uso de insumos produzidos a partir de PL de *C. procera*. Para isso, foram realizados testes de toxicidade oral em camundongos Swiss por 28 dias em três doses distintas de PL (1000, 500 e 250 mg/mL). Em seguida, foram analisados parâmetros bioquímicos, histológicos e hematológicos em busca de alterações que pudessem indicar toxicidade. Foram realizados ensaios in vitro para verificar a estabilidade de PL no trato digestivo, utilizando fluidos simulados de forma não sequencial e sequencial. Para investigar a alergenicidade das proteínas do látex, foi realizado um teste de contato (patch test) em humanos com biomembranas à base de PVA (BioMem CpLP). Nas três doses testadas para toxicidade, não foi documentada, dentro dos parâmetros analisados, qualquer mudança que pudesse ter sido provocada por PL como uma substância tóxica por via oral. Nos testes de digestibilidade in vitro, PL se manteve estável durante a digestão não sequencial e sequencial, além de permanecer com a sua atividade proteolítica estável durante o processo. No teste de alergenicidade, 52 voluntários humanos participaram do estudo, onde 12% destes apresentaram discreta reação alérgica na primeira fase, e 5% dos voluntários que concluíram a segunda fase apresentaram reação alérgica leve, sugerindo que PL não seriam seguras para uso terapêutico. O estudo sugere que as proteínas do látex de *C. procera* são seguras para uso de seu potencial terapêutico nessas condições.

Palavras-chave: alergia; biomembrana; digestibilidade; histopatologia; teste de contato.

ABSTRACT

Calotropis procera is a laticifer plant from the Apocynaceae family, native to India, widely used in traditional medicine, where several pharmacological properties of the latex soluble proteins (LP) of this species have been reported, such as anti-inflammatory, analgesic, antitumor, anticancer, anti-hyperglycemic, and antioxidant activities, among others. Recently, LP was used in the development of a rennet for cheese production and in the development of a polyvinyl alcohol (PVA)-based biomembrane for wound healing, tested in an animal model. Despite the studies conducted regarding the potential application of LP as a phytotherapeutic agent and the already reported safety of these proteins, the present study aims to improve the evaluation of their toxicological and allergenic properties, as well as to provide a better understanding of the safety of biotechnological inputs produced from *C. procera* LP. To this end, oral toxicity tests were performed in Swiss mice for 28 days at three different doses of LP (1000, 500, and 250 mg/mL). Biochemical, histological, and hematological parameters were then analyzed for changes that could indicate toxicity. To assess the stability of LP, in vitro digestibility assays were conducted in simulated gastric and intestinal fluids in both sequential and non-sequential manners. To investigate the allergenicity of latex proteins, a patch test was performed in humans using PVA-based biomembranes (BioMem CpLP). At the three doses tested for toxicity, no changes were observed within the analyzed parameters that could indicate LP as an orally toxic substance. In the allergenicity test, 52 volunteers participated in the study, with 12% experiencing a mild allergic reaction in the first phase, and 5% of those who completed the second phase also presenting a mild allergic reaction. These findings suggest that LP is safe for therapeutic use. This study suggests that *C. procera* latex proteins are safe for their therapeutic potential under these conditions.

Keywords: allergy; biomembrane; digestibility; histopathology; patch test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> (Aiton) W. T. Aiton.....	14
Figura 2 – Esquema de obtenção das proteínas do látex (PL).....	28
Figura 3 – Fotografia do dorso de um voluntário nas duas fases da pesquisa.....	33
Figura 4 – Eletroforese unidimensional das proteínas do látex em condições redutoras e não redutoras.....	35
Figura 5 – Peso corporal de camundongos tratados via oral com diferentes concentrações de PL durante 28 dias	36
Figura 6 – Consumo de ração e água de camundongos tratados com diferentes concentrações de PL durante 28 dias.....	37
Figura 7 – Cortes histológicos dos tecidos do fígado de camundongos tratados via oral com PL.....	40
Figura 8 – Cortes histológicos dos tecidos do baço de camundongos tratados via oral com PL.....	41
Figura 9 – Cortes histológicos dos tecidos do rim direito de camundongos tratados via oral com PL.....	42
Figura 10 – Cortes histológicos dos tecidos do rim esquerdo de camundongos tratados via oral com PL.....	43
Figura 11 – Cortes histológicos dos tecidos do timo de camundongos tratados via oral com PL.....	44
Figura 12 – Cortes histológicos dos tecidos do intestino de camundongos tratados via oral com PL.....	45
Figura 13 – Cortes histológicos dos tecidos do estômago de camundongos tratados via oral com PL.....	46
Figura 14 – Cortes histológicos dos tecidos do pâncreas de camundongos tratados via oral com PL.....	47
Figura 15 – Cortes histológicos dos tecidos do coração de camundongos tratados via oral com PL.....	48
Figura 16 – Cortes histológicos dos tecidos dos pulmões de camundongos tratados via oral com PL.....	49
Figura 17 – Digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex em fluido intestinal e gástrico simulados	53
Figura 18 – Digestibilidade sequencial das proteínas do látex em fluido gástrico e intestinal simulados e atividade proteolítica durante digestão	54

Figura 19 – Fotografia representativa dos voluntários que sentiram desconforto na primeira fase do teste de alergenidade por contato	55
Figura 20 – Fotografia representativa dos voluntários que testaram positivo na primeira fase do teste de contato	56
Figura 21 – Fotografia representativa do voluntário 36, positivo na segunda fase do teste de contato.....	56
Figura 22 – Fotografia do voluntário 44, negativo na primeira e segunda fase do teste de contato.....	57
Figura 23 – Fotografia do voluntário 47, negativo na primeira e segunda fase do teste de alergenidade por contato	58
Figura 24 – Fotografia do voluntário 48, negativo na primeira e segunda fase do teste de alergenidade por contato	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos Fototipos, de acordo com a classificação de Fitzpatrick	25
Tabela 2 – Escala de avaliação de investigação de dermatites de contato	34
Tabela 3 – Pesos relativos dos órgãos de camundongos tratados via oral com diferentes concentrações de PL	39
Tabela 4 – Análise hematológica de animais tratados via oral com diferentes concentrações de PL	51
Tabela 5 – Análise dos parâmetros bioquímicos de animais tratados via oral com diferentes concentrações de PL	52
Tabela 6 – Resultado do teste de contato em 52 voluntários testados com PL	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	<i>Calotropis procera</i>.....	14
1.2	Proteínas do látex.....	15
1.3	Toxicidade	18
1.4	Alergia.....	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Materiais.....	23
3.1.1	<i>Reagentes</i>	23
3.1.2	<i>Material Vegetal</i>.....	23
3.1.3	<i>Animais e alojamento</i>	23
3.1.4	<i>Voluntários</i>.....	24
3.1.4.1	<i>Critérios de inclusão para a participação da pesquisa</i>	24
3.1.4.2	<i>Critérios de exclusão para participação da pesquisa</i>.....	25
3.1.4.3	<i>Critérios de descontinuação e retirada da pesquisa</i>.....	26
3.2	Métodos.....	27
3.2.1	<i>Coleta do látex</i>.....	27
3.2.1.1	<i>Processamento do látex</i>.....	27
3.2.1.2	<i>Dosagem de proteínas</i>	27
3.2.1.3	<i>Atividade proteolítica</i>	28
3.2.1.4	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>.....	29
3.2.2	<i>Toxicidade subaguda oral</i>	29
3.2.2.1	<i>Análise hematológica</i>	30
3.2.2.2	<i>Análise bioquímica</i>.....	30
3.2.2.3	<i>Peso dos órgãos</i>	31
3.2.2.4	<i>Histopatologia</i>	31
3.2.3	<i>Suscetibilidade à digestão in vitro</i>	31

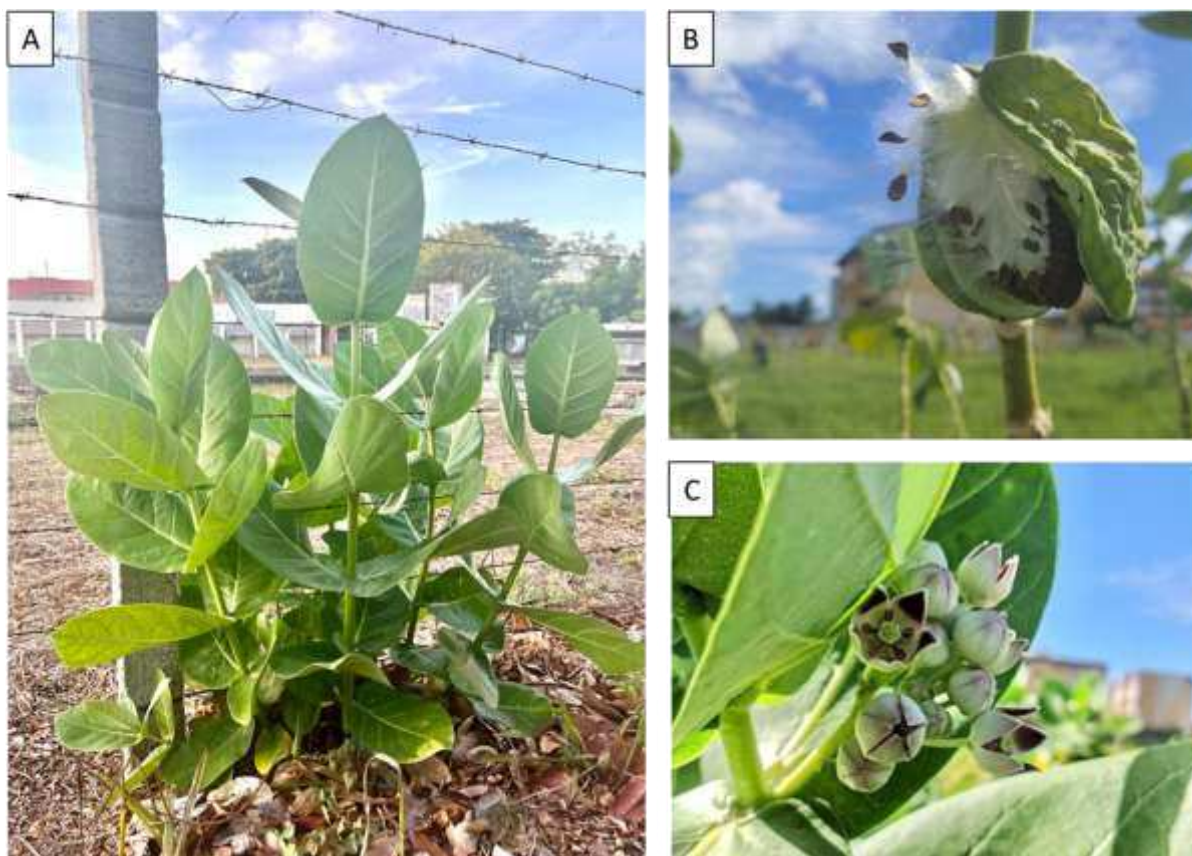
3.2.3.1	<i>Digestibilidade não sequencial</i>	31
3.2.3.2	<i>Digestibilidade sequencial</i>	32
3.2.4	<i>Alergenicidade</i>	32
3.2.4.1	<i>Patch Test</i>	32
4	RESULTADOS	35
4.1	Perfil eletroforético das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> e atividade proteolítica	35
4.2	Toxicidade subaguda oral	35
4.3	Digestibilidade <i>in vitro</i>	53
4.3.1	<i>Não Sequencial</i>	53
4.3.2	<i>Sequencial</i>	53
4.4	Alergenicidade por teste de contato	54
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 73	
	APÊNDICE B – CRONOGRAMA DA PESQUISA	76
	APÊNDICE C - ENTREVISTA APLICADA AOS VOLUNTÁRIOS	77
	APÊNDICE D – AVALIAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS	79
	APÊNDICE E – DADOS BRUTOS DO TESTE DE CONTATO	80
	APÊNDICE F – CARACTERÍSTICAS DOS VOLUNTÁRIOS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Calotropis procera*

Calotropis procera (Aiton) W. T. Aiton, é uma planta perene, do tipo arbustivo, pouco ramificada, podendo alcançar 3 a 4 metros de altura, pertencente à família Apocynaceae. Conhecida também como algodão de seda, paninha de seda, queimadura e jacaúna, sendo no Ceará mais conhecida como ciúme, flor de seda e hortência (Viana *et al.*, 2017) (Figura 1). Originária da Índia, vem sendo disseminada pelo mundo como planta ornamental. É uma espécie nativa de regiões tropicais, mas pode ser encontrada em regiões áridas e semiáridas da Ásia, África e Sul da América, incluindo o Brasil (Radhaboy *et al.*, 2019). Esta planta também é conhecida pela intensa produção de látex e seu crescimento ocorre em solos secos, arenosos e em climas quentes, podendo crescer como erva daninha em terrenos agrícolas (Tripathi *et al.*, 2022).

Figura 1 – Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton.



Fonte: autoria própria

A. Planta; B. sementes ligadas a fios de seda liberados pelo fruto deiscente; C. Inflorescência.

O látex produzido pela *C. procera* é rico em compostos bioativos como cardenolídeos, alcaloides, carboidratos, esteroides, terpenos, carbonatos orgânicos, além de peptídeos e proteínas como proteases cisteínicas, quitinases, osmotinas, inibidores de proteases entre outros, fazendo deste látex uma potente fonte de compostos com atividades farmacológicas (Freitas *et al.*, 2011; Bankole; Thiemann, 2022).

O uso popular desta espécie pode combater sintomas de doenças como febre, reumatismo, indigestão, tosse, resfriado, eczema, asma, elefantíase, náuseas, vômitos, diarreia (ABHISHEK *et al.*, 2010). Existe relatos no tratamento da hanseníase, doenças de pele, úlceras, hemorroidas, tumores, doenças do baço, do fígado e do abdome (Kritikar; Basu, 1999). Estudos fornecem evidências de suas propriedades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias, antidiarreicas, anticonvulsivantes, antimaláricas, hepatoprotetoras, antitumorais, antimicrobianas e antinociceptivas (Gilhotra; Ghule; Bairagi, 2018). Porém, ainda são necessários muitos estudos para comprovar as atividades e a eficácia e segurança do uso desta planta para fins terapêuticos.

A primeira atividade farmacológica do látex de *C. procera*, comprovada cientificamente, foi reportada por Kumar e Basu (1994), que mostraram seu potencial anti-inflamatório após inibição de edema de pata induzido por carragenina e formalina. Em seguida, foi determinado o potencial angiogênico e mitogênico (Rasik *et al.*, 1999). Em outro estudo foi avaliado a ação analgésica através da inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético em ratos (Dewan *et al.*, 2000). Recentemente, o extrato metanólico do látex de *C. procera*, foi eficaz em reduzir significativamente lesões da mucosa do cólon em ratos, sugerindo ser promissor em tratamentos inflamatórios do cólon (Kumar *et al.*, 2019).

1.2 Proteínas do látex

O látex coletado de *C. procera*, quando processado, tem sua borracha separada das proteínas solúveis, denominadas proteínas do látex (PL). Sabidamente, este material é rico em proteínas, com uma fração proteica predominantemente composta por proteínas básicas (PI > 6,0), com massas variando entre 5-95 kDa, sendo as de 26 kDa, aproximadamente, majoritárias. Apresenta atividade quitinolítica e forte atividade proteolítica conferida pelas proteases cisteínicas (Freitas *et al.*, 2007).

A atividade farmacológica destas proteínas tem sido exaustivamente estudada por nosso grupo de pesquisa, que tem demonstrado que as proteínas do látex apresentam atividade anti-inflamatória por via endovenosa e atividade pró-inflamatória (Alencar *et al.*, 2006).

Também foi observada atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas (Alzahrani; Almalki; Rizgallah, 2019), atividade antitumoral avaliada em camundongos transplantados com sarcoma 180 (Oliveira et al., 2010), ação depressora sobre o sistema nervoso central (Lima et al., 2010), ação anticonvulsivante avaliada pelo modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (Lima et al., 2012) e indução do controle glicêmico avaliado tanto em animais diabéticos (Oliveira et al., 2019) como em células de hepatocarcinoma humano HepG2, sugerindo fortemente o uso medicinal dessas proteínas como terapia para prevenção e/ou tratamento do diabetes tipo 2 (Oliveira et al., 2021).

A atividade anti-inflamatória das proteínas do látex foi documentada em diferentes modelos inflamatórios. Camundongos Swiss tratados via intraperitoneal com PL resistiram ao choque séptico de infecção letal com *Salmonella enterica* Typhimurium (Lima-Filho et al., 2010) e exibiram atividades semelhantes à trombina e à plasmina, mantendo a homeostase da coagulação em camundongos sépticos (Ramos et al., 2012). Além disso, protegeram os animais da infecção por *Salmonella* em modelo de febre tifóide (Oliveira et al., 2012; Sousa et al., 2020) e promoveram efeito protetor, anti-inflamatório e antioxidante em modelo experimental de câncer colorretal (Kumar; Verma; Das, 2022). Também demonstraram capacidade anti-inflamatória no tratamento de mucosite oral e intestinal em modelo animal, sugerindo atividade fitomoduladora dessas proteínas (Alencar et al., 2017; Ramos et al., 2020).

Outras atividades também foram identificadas, como ação antiartrítica, antiedematogênica e antioxidante da subfração de alto peso molecular das proteínas do látex de *C. procera* em ratos (Chaudhary et al., 2015, Chaudhary et al., 2016), além de propriedades imunomoduladoras que protegem contra infecções por *Listeria monocytogenes* (Nascimento et al., 2016). Recentemente, corpos de inclusão de uma proteína recombinante de látex de *C. procera* produzida em *E. coli* preveniram a inflamação aguda de listeriose (Tavares et al., 2022).

Uma biomembrana à base de álcool polivinílico (PVA), denominada BioMem CpLP, foi desenvolvida como um sistema de liberação de PL e demonstrou eficácia na remodelação tecidual em camundongos, acelerando significativamente a cicatrização de feridas por meio da formação de novos tecidos (Figueiredo et al., 2014). Posteriormente, foi avaliado o mecanismo de ação dessa biomembrana na cicatrização das feridas, onde induziu a migração de leucócitos e o aumento de marcadores e mediadores da resposta inflamatória, atuando na fase inicial do processo inflamatório pela liberação de citocinas (Ramos et al., 2016). Sendo o PVA um suporte inerte e absorvível, que libera PL na forma ativa, essa biomembrana se mostra adequada e promissora para processos fitoterápicos.

Recentemente, mais uma característica de PL foi explorada. Foi observado que enzimas presentes nas proteínas do látex de *C. procera* possuem capacidade de hidrolisar a caseína do leite bovino, gerando um coalho para a produção de queijo. Sabe-se que as proteases, também conhecidas como peptidases, estão envolvidas nesse processo e são amplamente utilizadas na indústria de laticínios para essa finalidade. Devido a restrições de consumo de alimentos que utilizam coalho animal por razões dietéticas ou religiosas, há um interesse crescente na busca por enzimas coagulantes alternativas à quimosina. Embora outras enzimas, como amilases (α -amilases e glicoamilases), lipases e pectinases, sejam utilizadas na indústria, as peptidases (quimosina, papaína, bromelaína e pepsina) representam cerca de 60% do mercado (González-Rábade et al., 2011; Vermelho et al., 2015).

Estudos recentes avaliaram fluidos laticíferos de diferentes espécies como novas fontes de peptidases capazes de hidrolisar as proteínas do leite bovino. As peptidases de *C. procera* foram capazes de hidrolisar totalmente as caseínas em 30 minutos a pH 6,5. Além disso, as proteínas do soro do leite foram mais resistentes à proteólise por peptidases do látex, mas, quando aquecidas no pré-tratamento, sofreram um maior grau de hidrólise e apresentaram redução na antigenicidade residual dos hidrolisados.

Ensaio *in vivo* demonstraram que as proteínas do leite bovino hidrolisadas por PL não induziram reações imunes em camundongos alérgicos ao leite bovino, sendo comparáveis a uma fórmula comercial parcialmente hidrolisada. Portanto, essas peptidases são enzimas promissoras para o desenvolvimento de novas fórmulas hipoalergênicas para crianças com alergia ao leite (Oliveira et al., 2019).

Uma protease cisteínica isolada das proteínas de *C. procera* foi capaz de hidrolisar a caseína de forma semelhante à quimosina bovina, demonstrando estabilidade a diferentes íons metálicos e alto índice de aceitação sensorial, revelando-se uma enzima alternativa à quimosina (Silva et al., 2020). Essa proteína foi imobilizada em suporte de glioxil-agarose, permitindo a reutilização da enzima com eficiência por até cinco ciclos e estabilidade de armazenamento de seis meses a 8°C, produzindo queijos de ótima qualidade (Oliveira et al., 2023).

Diante da vasta gama de atividades farmacológicas e do promissor arsenal biotecnológico presente na fração proteica do látex de *C. procera*, torna-se necessário um entendimento aprofundado sobre o uso seguro desse material. Para isso, os órgãos competentes exigem mais análises toxicológicas e alergênicas antes da aprovação de produtos derivados dessas proteínas.

1.3 Toxicidade

Há uma intensa busca por fontes naturais com potenciais farmacológicos para desenvolvimentos de medicamentos, porém não é dada a devida importância para os efeitos causados por estas biomoléculas ativas (Heinrich *et al.*, 2022). Apesar de serem naturais, estas substâncias devem ser utilizadas com responsabilidade, doses excessivas e uso concomitantemente com outras drogas podem apresentar reações adversas (Saggar *et al.*, 2022). As plantas, por serem seres sésseis, desenvolvem defesas químicas denominadas toxinas, em plantas laticíferas especificamente, existe uma diversidade de metabólitos especializados como alcalóides, terpenóides, fenólicos, cardenolídeos que desempenham papel defensivo contra herbívoros (Zhou *et al.*, 2022). A presença de cardenolídeos podem afetar crescimento e a oviposição de borboletas monarca, sendo fortes inibidores da fisiologia neural e inibidores das bombas de sódio-potássio (Agrawal *et al.*, 2021).

Primeiros estudos de toxicidade de *C. procera* revelaram que o látex bruto desta espécie por via oral, intravenosa ou intraperitoneal provocou a morte em cabras (Mahmoud *et al.*, 1979; El Badwi *et al.*, 1998). Além disso, casos de envenenamento intencional utilizando o látex de *C. procera* já foram relatados (Rutten; Statius Van Eps, 1998; Kosaraju *et al.*, 2015).

Estudos com o látex íntegro também foram feitos em ratos, Lima *et al.* (2011) constataram que o látex íntegro de *C. procera*, possui propriedades cardiotoxícas e hepatotóxicas após administração intraperitoneal. Fahim *et al.* (2016) avaliaram os efeitos tóxicos do látex de *C. procera* e definiram DL50 do látex por via oral, em 1,32 mL/kg. Complementarmente, Ahmed *et al.* (2016) descreveram efeitos tóxicos importantes de extratos etanólicos de folhas e látex de *C. procera* em animais após gavagem oral, com danos severos ao coração e testículos.

Recentemente, efeitos toxicopatológicos também foram estudados com extrato etanólico de folhas e caules de *C. procera* em embriões de galinha e mostrou ser tóxico na dosagem mais elevada testada, 100 mg/kg de peso do ovo (Tavakkoli *et al.*, 2019).

Contudo, Singhal e Kumar (2009), avaliaram os efeitos tóxicos de uma suspensão aquosa do látex seca de *C. procera*, livre da borracha, sobre a função hepática e renal de ratos. A suspensão foi administrada por 45 dias, via oral, nas doses de 10, 100 e 400 mg/kg e nenhum efeito adverso foi observado durante o período de tratamento. Desta maneira, o estudo sugere que a fração da borracha seja a principal responsável pelos efeitos tóxicos.

Entre os constituintes do látex de *C. procera*, aproximadamente 85% é composto de borracha e cerca de 10% de fração proteica solúvel com proteínas de peso molecular

variando entre 10 e 66 kDa. Dessa maneira supomos que a borracha pode ser responsável, pelo menos em parte, por alguns efeitos adversos relatados com o látex. (Freitas, 2006; Freitas *et al.*, 2007).

A remoção eficiente do conteúdo de borracha não é uma tarefa trabalhosa no caso do látex de *C. procera* e, portanto, isso não deve ser um impedimento para explorar completamente os usos farmacológicos reivindicados para esta planta.

Muitas pesquisas produziram resultados preliminares sobre a avaliação de toxicidade das proteínas do látex de *C. procera*. A toxicidade aguda foi determinada em camundongos após administração oral e intraperitoneal. A toxicidade aguda oral foi investigada com doses elevadas de PL (5000 e 2000 mg/kg/pc) e não foi documentada alteração adversa em animais em termos de sobrevivência. Foi relatado que os animais exibiram apenas alterações comportamentais discretas, de tempo limitado, e aumento de monócitos no sangue. Entretanto, quando animais foram tratados por via intraperitoneal com dosagens de PL de 150 mg/kg, foram documentadas mortes em 1 hora, enquanto que, com PL (75 mg/kg), houve 80% de sobrevivência, porém com sinais de efeitos nocivos no peritônio. Em outra avaliação, foi observada tolerância imunológica oral quando PL foi avaliada por imunização intraperitoneal em ratos que receberam PL oralmente antes. Isso foi confirmado pela redução de IgE e IgG no soro, IL-4 e IFN- γ nos homogenatos de baço e pela ausência de sinais de anafilaxia (Bezerra *et al.*, 2017).

Por tanto, faz-se necessário aprofundar os estudos acerca da toxicidade oral de PL devido ao potencial de PL na coagulação de leite e fabricação de queijo (Silva *et al.*, 2020). O uso de PL como coagulante de leite a partir de enzimas do extrato das folhas *C. procera* resultou na fabricação de queijo com boa aceitação sensorial não revelou efeitos adversos de toxicidade até a dose mais alta testada, 134,2 mg/kg. Não houve alteração nas análises macroscópicas dos órgãos em comparação com o controle nem alterações no comportamento dos camundongos, nenhuma morte foi registrada em 14 dias de avaliação (Abebe; Emire, 2020).

1.4 Alergia

A alergia é uma resposta exagerada do sistema imunológico contra alérgenos, substâncias estranhas que podem entrar em contato com o organismo por diferentes vias, respiratória, cutânea ou por ingestão. Cada organismo reage de maneira diferente frente a esses

alérgenos, desde ausência de reações a reações muito graves como anafilaxia, dependendo da sensibilidade de cada organismo (Galli; Tsai Piliponsky, 2008).

A hipersensibilidade imediata, classificada como hipersensibilidade do tipo I, é uma manifestação clínica da resposta imune contra moléculas estranhas, conhecidas como alérgenos, que induzem a síntese de imunoglobulinas IgE (Dispenza, 2019). No primeiro estágio do desenvolvimento de doenças alérgicas ocorre uma fase de indução ocasionada pelo antígeno, chamada de sensibilização alérgica, em resposta, o corpo produz sistematicamente anticorpos IgE associados a mastócitos. Posteriormente, em um segundo momento de exposição do indivíduo já sensibilizado, mediadores sintetizados e pré-formados são liberados provocando uma reação inflamatória sistêmica que caracteriza os sintomas clínicos da alergia (Gómez-Casado; Díaz-Perales, 2016).

A dermatite alérgica de contato corresponde a uma reação inflamatória cutânea causada pelo contato com um agente externo caracterizada por lesões como eritema, vesículas, pápulas que podem ocorrer isoladas ou em associação após o contato direto ou indireto com substâncias que são prejudiciais à pele (Motta; Aun; Giavina-Bianchi, 2011). É mediada por um mecanismo de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia, e requer sensibilização prévia do indivíduo. A dermatite pode ser classificada como alérgica, na qual um mecanismo imunológico está envolvido, ou apenas irritativo, quando não há uma sensibilização.

O teste de contato é o método mais eficiente para diagnóstico da dermatite alérgica de contato, sendo considerado padrão ouro para identificar hipersensibilidade tardia. É um teste de investigação com protocolo estabelecido, onde é aplicado alérgenos no dorso superior do paciente com o propósito de desencadear uma reação localizada, seguido de uma primeira leitura de 48 horas e uma segunda de 72 a 96 horas (Brar, 2021).

Este teste não é simples, porém depende de diversos fatores, como uma boa avaliação do paciente considerando as diferentes fontes de exposição a possíveis alérgenos, a técnica correta do uso dos adesivos e os conhecimentos para interpretar adequadamente os resultados e determinar sua relevância. (Nixon; Allnutt; Diepgen, 2020).

Existe uma hipótese que o aumento das doenças alérgicas está associado a limpeza excessiva durante os primeiros estágios da vida, entre outros fatores, como poluição do ar, exposição a substâncias químicas irritantes, diminuição da frequência da amamentação e mudanças nos hábitos alimentares. Certos estímulos, como infecções, podem ajudar no desenvolvimento imunológico para um equilíbrio saudável das respostas imunes. No entanto, essa hipótese não explica em nível molecular porque algumas proteínas são mais alergênicas do que outras (Frei *et al.*, 2012).

Em plantas, também são encontrados alérgenos proteicos que induzem respostas imunes mediadas por IgE, possuem estrutura tridimensional compacta, um elevado número de pontes dissulfeto e glicosilações que conferem estabilidade ao sistema gastrointestinal. Entre eles, no grupo das PR-proteínas, (proteínas vegetais relacionadas à defesa) pode-se encontrar algumas proteínas consideradas alérgenos. (Sinha *et al.*, 2014). Dessa maneira, o látex mostra-se uma fonte potencial de alérgeno, uma vez que é rico em PRs que realizam ligações cruzadas com IgE devido a homologia com muitos alérgenos vegetais (Asero, 2011).

No látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, essas proteínas associadas às partículas da borracha e as proteínas citosólicas do soro somam um pequeno número de proteína que deu origem ao problema de alergia ao látex reconhecido pela União Internacional de Sociedades Imunológicas (IUIS) (Yeang *et al.*, 2002). A partir do látex de *Hevea brasiliensis* foi elaborada uma biomembrana vegetal usada como curativo para úlceras cutâneas, onde foi avaliada em relação à hipersensibilidade. Mostrou-se ser segura como curativo, pois não induziu reações de hipersensibilidade entre os voluntários submetidos ao “patch test”, nem entre os usuários da biomembrana vegetal, como demonstrado clínica e imunologicamente pela dosagem de IgE (Frade *et al.*, 2011).

Ramos e colaboradores, 2007, avaliou o potencial alergênico da fração proteica do látex de *C. procera* (PL), que foi capaz de induzir respostas alérgicas com produção de IgE e sinais de anafilaxia, por imunização subcutânea, entretanto quando administrado por via oral, estes parâmetros não foram observados. Contudo, é importante avaliar o potencial alergênico através do teste de contato para o uso seguro da biomembrana, BioMem CpLP, como fitoterápico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a segurança de uso das proteínas do látex de *C. procera* para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos para alimentos e fitoterapia.

2.2 Objetivos específicos

- Obter as proteínas do látex de *C. procera*;
- Avaliar o perfil comportamental e sintomas de toxicidade em modelo animal tratados com as proteínas do látex de *C. procera* em doses repetidas;
- Determinar parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos de camundongos tratados com as proteínas do látex de *C. procera*;
- Avaliar a suscetibilidade das proteínas do látex de *C. procera* frente a enzimas digestivas *in vitro* em fluido gástrico e intestinal simulado de forma sequencial e não sequencial;
- Estudar o potencial clínico de irritabilidade e sensibilidade cutânea de uma biomembrana composta de proteínas do látex de *C. procera*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Membrana de diálise com poro de exclusão de 8.000 Da, marcadores de massa molecular, persulfato de amônio, acrilamida, bis-acrilamida, glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, DTT, dodecil sulfato de sódio (SDS), Coomassie brilhante-blue, pepsina (E.C. 3.4.4.1), pancreatina (E.C. 3.4.21.70) e tripsina (E.C. 3.4.2.1.4), Albumina Sérica Bovina (BSA), heparina, Hematoxilina-eosina, formol, kits bioquímicos: aspartato aminotransferase (labtest ref. 109), alanina aminotransferase (labtest ref. 1008), colesterol (labtest ref. 76), ureia CE (labtest ref. 27), albumina (labtest ref. 19), proteínas totais (labtest ref. 99), fosfatase alcalina (labtest ref. 79), creatinina (labtest ref. 127), ácido úrico (labtest ref. 140).

Cartela adesiva hipoalergênica para “patch test” com discos de papel de filtro de 1,0 cm²; Solução fisiológica estéril 0,9% (NaCl 0,9%); Câmaras em fita adesiva hipoalergênica para teste de contato e fitas semi-oclusiva não-permeável hipoalergênica.

3.1.2 Material Vegetal

A coleta do látex de *Calotropis procera* foi realizada nas proximidades da praia do Icaraí e do Cumbuco, Caucaia-CE. A espécie, pertencente à família Apocynaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará conforme a exsicata de número 32663.

3.1.3 Animais e alojamento

Os camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas nulíparas não grávidas, com peso variando entre 25 a 30 gramas, oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram utilizados para os ensaios de toxicidade. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Plantas Laticíferas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Foram alojados em caixas de polipropileno à temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), umidade entre 50-60% e com ciclo de luminosidade de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, recebendo ração e água à

vontade. O período de aclimação foi de 5 dias. Os animais foram designados aleatoriamente para os grupos controle (salina) e tratamento (1000, 500 e 250 mg/kg). Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovados sob o número de protocolo nº 9812011019. Os animais foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e todos os esforços foram feitos para minimizar o distresse e sofrimento dos animais. Ao final dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg). As carcaças foram recolhidas e incineradas pela empresa Engenium.

3.1.4 Voluntários

Para as análises de alergenicidade *in vivo* foram recrutados voluntários que obedeceram aos critérios de inclusão do experimento, detalhado em 3.1.4.1. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) para poderem participar do *Patch Teste*, onde foi explicado detalhadamente todo o processo experimental, bem como esquematizado com um cronograma (APÊNDICE B). Foi realizada uma entrevista com cada voluntário, onde foi preenchido dados pessoais e algumas respostas específicas para pesquisa, como: doenças existentes, antecedentes de hipersensibilidade, fototipo, uso de medicamentos e antecedente de contato com a planta em estudo (APÊNDICE C).

Os encontros aconteceram no Campus do PICI, no departamento de Bioquímica ou no Campus do Porangabuçu, no NPDM (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos). Um projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) com o título “ESTUDO CLÍNICO DO POTENCIAL DE IRRITABILIDADE E SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA DE UMA BIOMEMBRANA COMPOSTA DE PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera*”

3.1.4.1 Critérios de inclusão para a participação da pesquisa

- Pessoas saudáveis;
- Pele íntegra na região de teste;
- Concordância em aderir aos procedimentos e exigências do ensaio e comparecer nos dias e horários determinados para as avaliações;

- Capacidade de consentir sua participação por escrito;
- Ambos os sexos (feminino e masculino);
- Idade de 18 a 60 anos;
- Fototipo (Fitzpatrick): I a IV, conforme a escala de Fitzpatrick (1979) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos Fototipos, de acordo com a classificação de Fitzpatrick

Fototipo	Resposta a exposição solar
I	Queima-se sempre, nunca se bronzeia;
II	Queima-se sempre, bronzeia-se minimamente;
III	Queima-se moderadamente, bronzeia-se gradualmente;
IV	Queima-se minimamente, bronzeia-se bem;
V	Raramente se queima, bronzeia-se intensamente;
VI	Nunca se queima, pele profundamente pigmentada.

Fonte: autoria própria

3.1.4.2 Critérios de exclusão para participação da pesquisa

- Marcas cutâneas na área experimental que interfiram na avaliação de possíveis reações;
- cutâneas (distúrbios da pigmentação, más-formações vasculares, cicatrizes, pilosidade, queimaduras solares);
- Dermatoses ativas (local ou disseminada) que possam interferir nos resultados do estudo;
- Gestante, lactante ou cônjuges de gestantes ou lactantes;
- Exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento até 15 dias antes da avaliação inicial ou durante o estudo;
- Previsão de exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento, durante o período de condução do estudo;
- Previsão de tomar banho de mar, piscina ou banheira, sessão de sauna ou prática de esportes aquáticos ou que levem a suor intenso durante o estudo;

- Uso dos seguintes medicamentos de uso tópico ou sistêmico: imunossupressores, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais, e corticoides até 02 semanas antes da seleção;
- Tratamento estético e/ou dermatológico corporal até 03 semanas antes da seleção ou durante o estudo;
- Pessoas com dermatografismo (doença de pele caracterizada pela reação de hipersensibilidade da pele quando riscada, raspada, esfregada ou de outra forma traumatizada).

3.1.4.3 Critérios de descontinuação e retirada da pesquisa

- Aplicar qualquer outro produto na região experimental (dorso);
- Realizar tratamentos estéticos ou dermatológicos corporais;
- Alterar tratamento hormonal;
- Alterar método contraceptivo medicamentoso;
- Tomar banho de mar, piscina ou se expor à sauna durante o estudo;
- Retirar o teste de contato;
- Usar roupas justas que possam remover o adesivo através de fricção ou causar vermelhidão;
- Se expor à luz solar intensa prolongada e não se submeter a câmaras de bronzeamento artificial;
- Utilizar as seguintes medicações: corticoides, anti-histamínicos, imunossupressores, anti-inflamatórios não hormonais de uso contínuo (este último acima de 3 dias; uso esporádico deverá ser avaliado pelo investigador quanto a exclusão do estudo);
- Faltar em mais de duas vezes alternadas desde que não seja no primeiro dia da pesquisa e no retorno após o período de descanso;
- Caso o participante deseje desistir de participar do estudo;
- Caso participante precise iniciar tratamento com corticoide.

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta do látex

O látex de *Calotropis procera* foi coletado em áreas próximas ao litoral, sempre no período da manhã entre 7 e 9 horas. A coleta foi feita através de incisões no ápice caulinar da espécie, o látex foi recolhido em tubos de 50 mL, contendo 20 mL de água destilada, de forma que o látex foi misturado imediatamente com a água na proporção de 1:1 (v/v). A coleta de até 20 mL é obtida de um único exemplar da planta e se completa aproximadamente entre 10-15 min (Ramos *et al.*, 2010).

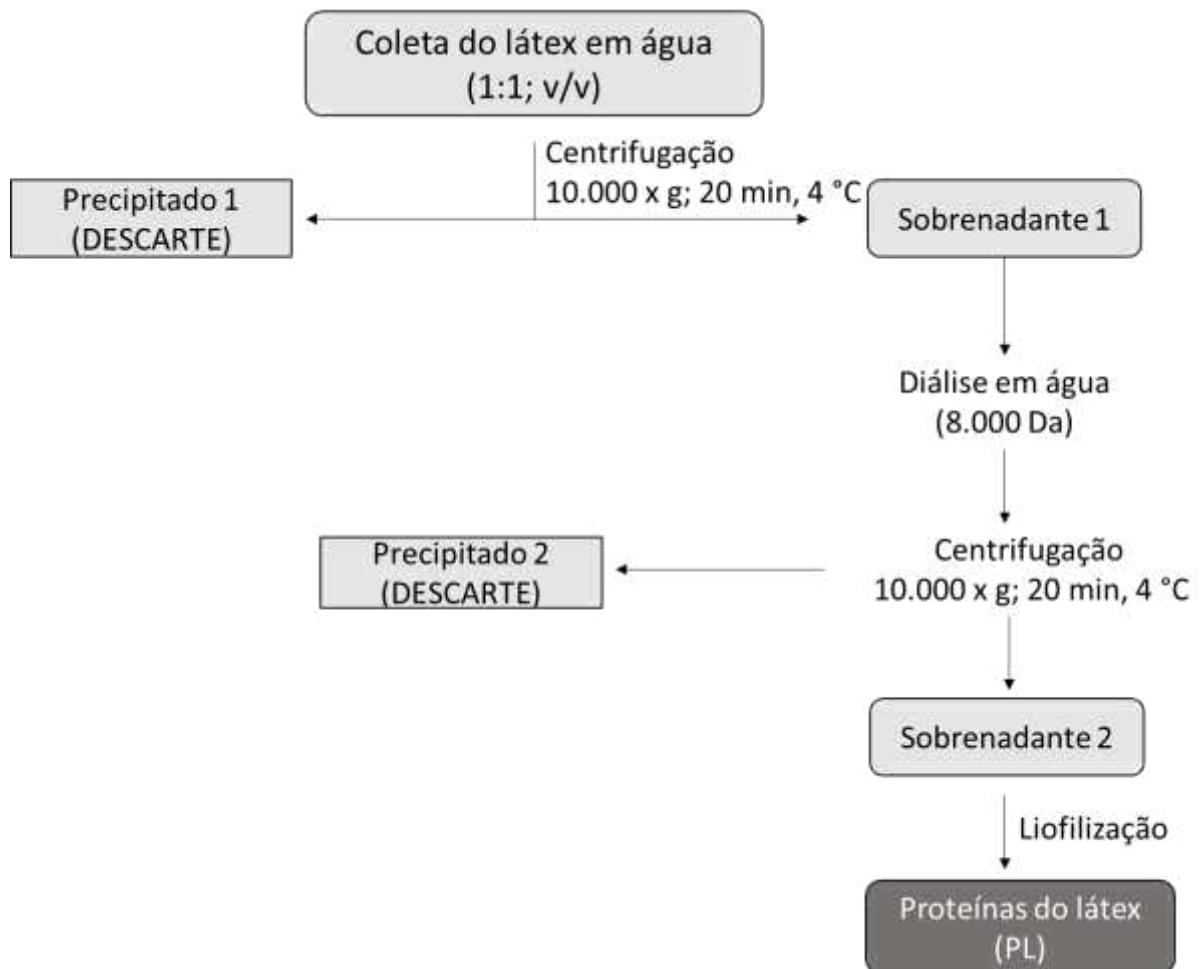
3.2.1.1 Processamento do látex

Logo após a coleta, o látex foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min. a 4° C para a remoção da borracha presente no material. O sobrenadante foi submetido à diálise em membranas com poros de 8.000 Da, contra água destilada a 4°C durante três dias (com três trocas de água por dia, totalizando 9 trocas). Após a diálise, foi realizado mais uma centrifugação, nas mesmas condições acima, para a obtenção de um sobrenadante límpido e completamente desprovido de borracha (Alencar *et al.*, 2006). Esta fração, denominada Proteínas do Látex (PL) foi submetida ao processo de liofilização. Este material foi armazenado em potes hermeticamente fechados a temperatura ambiente para posteriores análises (Figura 2).

3.2.1.2 Dosagem de proteínas

O teor proteico, nas soluções preparadas, foi estimado pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Dessa forma, em tubos de ensaio, foi adicionado 2,5 mL do reagente de Bradford a 100 µL da amostra em diferentes concentrações, agitando levemente. Após 10 min de repouso, as misturas foram submetidas a leituras por um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como referência padrão para a curva de calibração.

Figura 2 – Esquema de obtenção das proteínas do látex (PL)



Fonte: Autoria própria

3.2.1.3 Atividade proteolítica

O substrato inespecífico azocaseína foi utilizado para investigar a atividade proteolítica das proteínas do látex (Freitas *et al.*, 2007). Em um microtubo de 1,5 mL foi colocado 40 µL da solução de proteína (1 mg/ mL em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 com DTT 3 mM), posteriormente foi incubada por 10 min. para ativação das proteínas cisteínicas. Em seguida, o volume foi ajustado para 300 µL com o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e foram adicionados 200 µL de azocaseína 1%, posteriormente, incubada por 30 min. a 37 °C, após esse período a reação foi parada com ácido tricloroacético 12% (TCA) e centrifugada a 10.000 x g, 25 °C por 10 min. Transferiu-se 400 µL do sobrenadante para um novo tubo e foi acrescentado 400 µL de hidróxido de sódio 2 N. Em seguida, a absorbância foi

medida no espectrofotômetro a 440 nm. Ao branco, foi adicionada azocaseína após a parada da reação com TCA. Uma unidade de atividade foi definida com a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01.

3.2.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas do látex foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes, seguindo Laemmli (1970), na presença e ausência de β -mercaptoetanol 5%. Foi utilizado gel de aplicação contendo 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS 1% e gel de separação contendo 15% de poliacrilamida tampão de Tris-HCl 3M, pH 8,8, SDS 1%.

A eletroforese foi realizada sob corrente de 30 mA e 110 V, durante aproximadamente 2 horas, utilizando a solução de Tris 0,025 M pH 8,3 contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. Após a corrida o gel foi corado com soluções de Coomassie blue R-250 e descorado em solução de ácido acético, água destilada e metanol (4:1:5, v:v:v).

Foram utilizados os seguintes marcadores moleculares para estimativa da massa molecular: fosforilase β (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

3.2.2 Toxicidade subaguda oral

Os testes de toxicidade subaguda foram realizados de acordo com as orientações para testes de produtos químicos da OECD, número 407, 3 de outubro de 2008, com adaptações, que consiste em um estudo de toxicidade oral de 28 dias de dose repetida em roedores e fornece informações sobre possíveis riscos para saúde que podem surgir de repetidas aplicações durante um período limitado (OECD, 2008).

Para o teste de toxicidade foram utilizados 36 camundongos Swiss, de 8 a 9 semanas de vida, sendo 6 machos e 6 fêmeas, para cada tratamento e controle, mantidos nas condições já descritas. Os animais foram tratados por gavagem diariamente por 28 dias com PL nas doses 1000 mg/kg, 500 mg/kg e 250 mg/kg, no grupo controle foi administrado apenas o veículo (salina 0,9 %), os animais foram observados diariamente para detecção de sinais de toxicidade, morbidade e mortalidade.

Ao longo do experimento, os animais foram pesados e avaliados quanto ao consumo de água e ração a cada 3 dias. No vigésimo nono dia, os animais foram anestesiados para retirada de sangue (submetido a análises hematológicas e bioquímicas) sendo, em seguida, eutanasiados. Além de sangue, foram também retirados o fígado, baço, rim direito e esquerdo, timo, intestino, estômago, pâncreas, coração e pulmões, os quais foram analisados quanto à presença de alterações macroscópicas, pesados para determinação do seu peso relativo e submetidos a análises histopatológicas.

3.2.2.1 Análise hematológica

Amostras de sangue dos camundongos, tratados e controles, previamente anestesiados, foram coletadas via plexo retro-orbital em diferentes tubos contendo o anticoagulante heparina. As análises hematológicas foram realizadas utilizando um analisador hematológico semiautomático (scil Animal Care Company, Gurnee, IL, USA), avaliando os seguintes parâmetros: WBC (leucócitos totais, 10^9 células/L), LYM (linfócitos totais, 10^9 células/L), LY% (percentual de linfócitos), RBC (eritrócitos, 10^{12} células/L), HGB (hemoglobina, g/dL), HCT (hematócrito, %), MCV (volume corpuscular médio, fL), MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média, g/dL) e PLT (plaquetas, 10^9 células/L).

3.2.2.2 Análise bioquímica

Alíquotas de sangue dos camundongos tratados e controles foram coletadas em diferentes tubos sem o anticoagulante. Estes tubos foram centrifugados a $3.000 \times g$ por 15 minutos para separação do soro. Parâmetros clínicos foram mensurados seguindo os protocolos estabelecidos em cada kit, incluindo: aspartato aminotransferase (AST, U/ L), alanina aminotransferase (ALT, U/ L), colesterol (mg/ dL), ureia (mg/ dL), albumina (g/ dL), proteínas totais (g/ dL), fosfatase alcalina (U/ L), creatinina (mg/ dL), ácido úrico (mg/ dL), glicemia (mg/ dL).

3.2.2.3 *Peso dos órgãos*

Órgãos vitais incluindo fígado, baço, rim direito e esquerdo, timo, intestino, estômago, pâncreas, coração e pulmões foram pesados individualmente e o peso relativo de cada órgão foi calculado através da fórmula:

$$\text{Peso Relativo} = \frac{\text{peso do órgão}}{\text{peso do animal}} \times 100$$

3.2.2.4 *Histopatologia*

Órgãos vitais como, fígado, baço, rim direito e esquerdo, timo, intestino, estômago, pâncreas, coração e pulmões foram extraídos dos animais e fixados em formol-tamponado 10%. O material foi desidratado e diafanizado antes da inclusão em parafina para corte no micrótomo, onde cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâmina de microscópio. Hematoxilina-eosina foi utilizada para corar as lâminas para as avaliações microscópicas. Lesões microscópicas foram descritas, bem como sua incidência e grau de severidade como inflamação, necrose e fibrose.

3.2.3 *Suscetibilidade à digestão in vitro*

3.2.3.1 *Digestibilidade não sequencial*

Para avaliar a suscetibilidade à digestão *in vitro* de PL de acordo com Farias *et al.* (2015b) e Fu; Abbott; Hatzos (2002), com algumas modificações. As amostras foram incubadas individualmente em fluido gástrico simulado (FGS) e no fluido intestinal simulado (FIS). Desta maneira, PL (5 mg/ ml) foi incubada em FGS (NaCl 34 mM, 0,7% HCl, pH 2,0 e 1 mg / mL de pepsina) a 37 °C. Após 15, 30, 60, 120 minutos de incubação, o material digerido em FGS foi adicionado ao tampão de parada (2% SDS, 10% glicerol, 6% β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol, 200 mM DTT e 500 mM Tris-HCl pH 2,0). Enquanto o material digerido em FIS foi fervido por 5 minutos para parada da reação. Para avaliar a digestibilidade, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e Tricina. Um gel de poliacrilamida 17,5% por 5% foi preparado e as amostras da digestão foram corridas em Tampão Tris-Tricina-SDS a 10 °C a 300 V, 55-75 mA por gel.

3.2.3.2 Digestibilidade sequencial

Uma solução de PL a 4 mg/ mL foi digerida sequencialmente por pepsina em pH 2 por 2 horas na fase de fluido gástrico simulado, em seguida por tripsina em pH 6,5 por 2,5h à 37 °C na fase de fluido intestinal simulado. As enzimas foram adicionadas numa razão 13:1 (enzima: substrato). Após as 2h de digestão no fluido gástrico, foi recolhida uma alíquota para análise por eletroforese e a reação teve o pH ajustado para 6,5 com adição de Tris 1M pH 8,0. Alíquotas de 200 µL foram coletadas após 2h e 4,5h e transferidas para um tampão de parada, a digestibilidade de PL foi monitorada por Tricine-SDS-Page como descrito anteriormente (VERMEIRSEN *et al*, 2004).

3.2.4 Alergenicidade

3.2.4.1 Patch Test

Toda a participação na pesquisa foi de caráter voluntário, confirmada pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado. Neste documento, todos os aspectos relacionados à pesquisa foram explicados ao participante antes da assinatura, sendo elaborado de acordo com as especificações das Boas Práticas Clínicas (BPC), da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466/2012 e das exigências regulatórias internacionais do Conselho Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos em Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH).

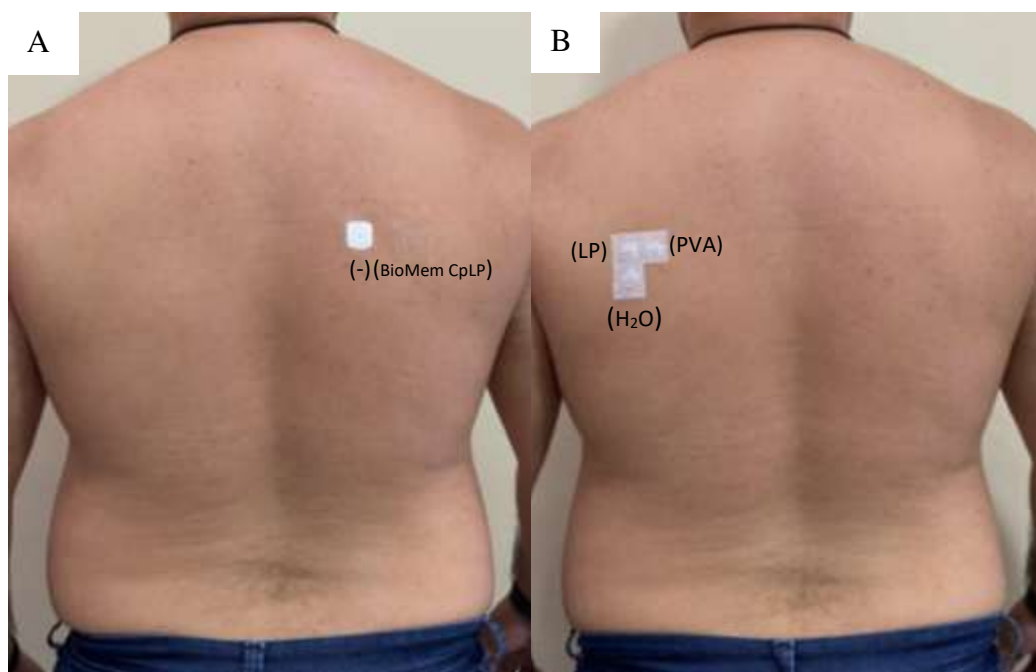
Para o teste tópico de alergenidade, dividido em duas fases (Fase de indução e Fase desafio) os voluntários foram sensibilizados, na fase de indução, e entraram em contato com uma biomembrana composta por PVA e PL, denominada BioMem CpLP, que foram aplicadas três vezes por semana na região superior do dorso direito dos voluntários, durante três semanas consecutivas, em dias alternados, totalizando nove aplicações. A biomembrana foi removida a cada 2 dias após sua aplicação pelo responsável da pesquisa, a cada remoção após o intervalo de 30 min houve uma leitura, e em seguida foi feito a aplicação de uma nova biomembrana no mesmo local, as observações e avaliações foram documentadas (APÊNDICE D) e registradas com fotos (Walberg; Magnus, 2006) (Figura 3).

Após a fase de indução, houve um período de repouso de, no mínimo, 10 dias, quando nenhuma biomembrana foi aplicada.

Após esse repouso, os participantes retornaram para nova aplicação do produto, foi feito uma aplicação em uma nova área do dorso, lado esquerdo na região superior, utilizando câmaras em fitas adesivas hipoalergênicas para teste de contato, onde foi colocado 20 μ L de PL (10% p/v) com o auxílio de um disco de papel filtro e para o controle negativo foram utilizados PVA 1% p/v e solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Figura 3).

Após um período de 48 horas em contato com a pele, na fase de desafio, a fita foi removida e, após um intervalo de 30 minutos, as áreas de possíveis lesões foram avaliadas. Uma segunda leitura foi realizada após 72 horas. Imagens digitais foram registradas em cada fase do procedimento.

Figura 3 – Fotografia do dorso de um voluntário nas duas fases da pesquisa



Fonte: Autoria própria

Fotografia representativa do dorso do voluntário; A- primeira fase da pesquisa, a biomembrana de PL (BioMem CpLP) e o controle anexados ao lado direito do dorso por 3 semanas com leituras feitas a cada 2 dias; B – segunda fase da pesquisa, onde foi aplicado câmaras adesivas para teste de contato contendo, PL, PVA e H₂O por 48h de contato.

Durante as leituras, a escala de avaliação preconizada pelo Grupo Internacional Investigador de Dermatites de Contato - ICDRG - (Spiewak, 2008), foi utilizada para avaliar os efeitos da biomembrana. Para a análise dos resultados foi adotada uma escala diferente, com valores equivalentes à escala do ICDRG, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Escala de avaliação de investigação de dermatites de contato

Escala adotada na pesquisa		Escala ICDRG	
<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
X	Não aplicado / Não realizada leitura		
F	Falta		Sem equivalência
R	Retirado da Pesquisa		
		- ou Ø	Sem alterações cutâneas
0	Reação ausente (teste negativo)	IR	Inflamação limitada à área exposta. Nenhuma infiltração. Pequenas petéquias. Pústulas. Eflorescências diferentes de pápulas ou vesículas.
1	Eritema Leve (não há evidência de sensibilização - teste negativo)	?+	Eritema leve
2	Eritema Nítido (reação de sensibilização fraca – teste positivo)	+	Eritema palpável. Edema/infiltrado moderado. Pápulas poucas ou ausentes. Vesículas ausentes.
3	Eritema + Edema + Pápulas (reação de sensibilização forte – teste positivo)	++	Infiltrado forte. Pápulas em grande quantidade. Vesículas presentes.
4	Eritema + Edema + Pápulas + Vesículas (reação de sensibilização extrema – teste positivo)	+++	Vesículas coalescentes. Bolhas. Ulceração.

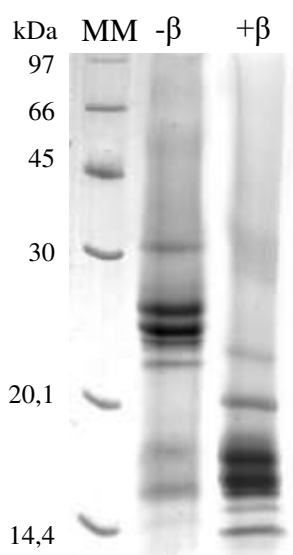
Fonte: autoria própria

4 RESULTADOS

4.1 Perfil eletroforético das proteínas do látex de *Calotropis procera* e atividade proteolítica

O perfil eletroforético das proteínas obtidas pelo processamento do látex de *Calotropis procera* (PL) está representado na figura 4. O perfil eletroforético da amostra sem β -mercaptoetanol apresentou bandas com diferentes massas moleculares, mas quando tratada com β -mercaptoetanol apresentou bandas reduzidas, com pesos moleculares abaixo de 30 kDa,

Figura 4 – Eletroforese unidimensional das proteínas do látex em condições redutoras e não redutoras



Fonte: autoria própria

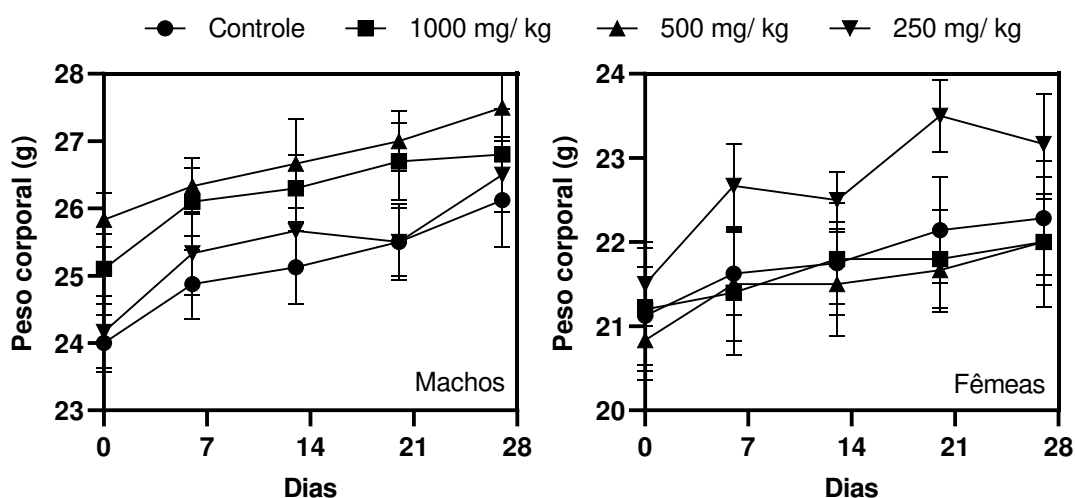
Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS PAGE), MM: marcadores de massa molecular; -β: PL sem presença de β -mercaptoetanol; +β: PL na presença de β -mercaptoetanol.

4.2 Toxicidade subaguda oral

Calotropis procera tem uma baixa toxicidade por via oral quando realizado o estudo de toxicidade aguda de 14 dias, se enquadrando na classe 5, baixa toxicidade, substância com DL50 superior a 5000 mg/kg (Bezerra *et al*, 2017). Durante o experimento em nenhuma das dosagens testadas de PL (1000mg/kg; 500mg/kg e 250mg/kg), algum animal veio a óbito. Não houve alteração comportamental ou sinal de toxicidade nos animais durante o período de

análise. O peso dos animais foi avaliado antes e durante o decorrer do experimento, a cada 7 dias. A perda de peso em uma avaliação clínica é considerada como um sinal de toxicidade, contudo mesmo na dosagem de 1000 mg/kg não houve perda de peso quando comparado ao grupo controle (Figura 5). O consumo de água e ração foram medidos a cada 3 dias e teve um padrão semelhante ao grupo controle (Figura 6).

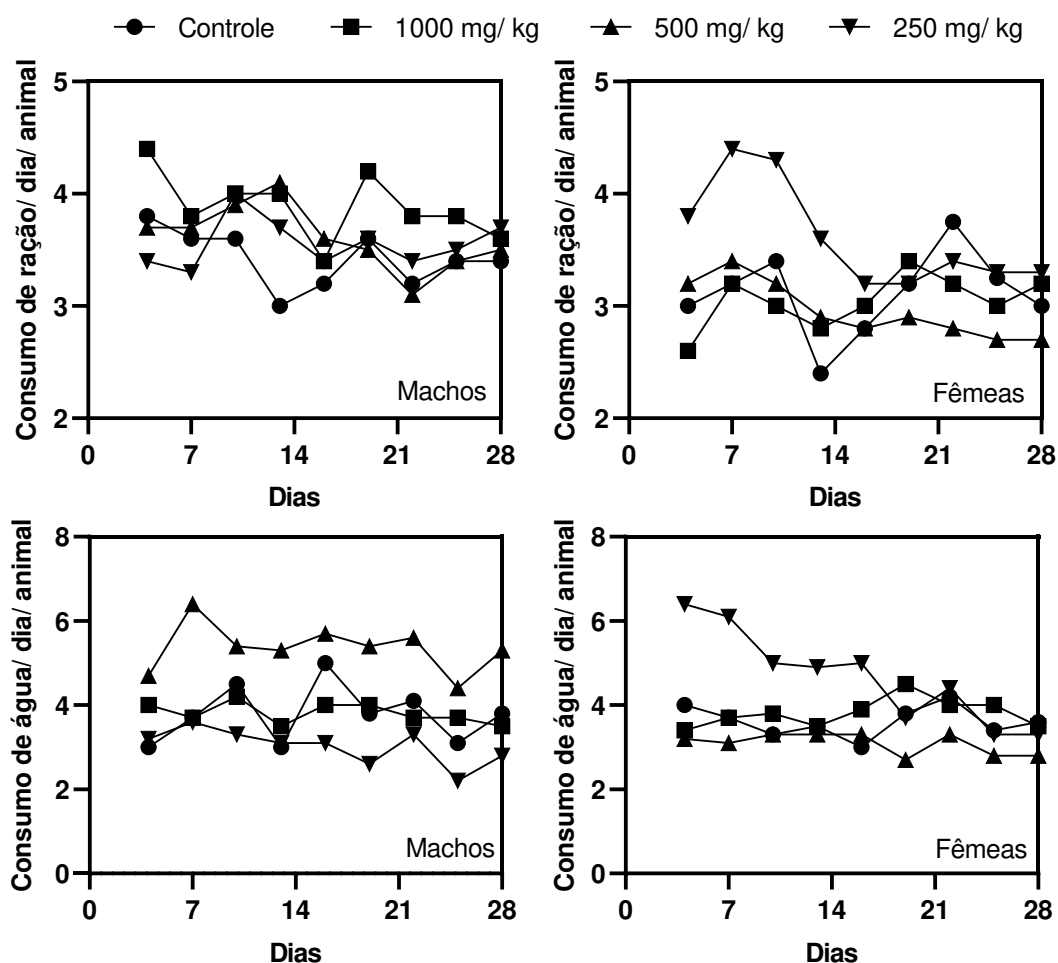
Figura 5 – Peso corporal de camundongos tratados via oral com diferentes concentrações de PL durante 28 dias



Fonte: autoria própria

Camundongos Swiss ($n = 6$) foram tratados por via oral com diferentes concentrações de proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* durante 28 dias. Controle: animais que receberam salina; 1000, 500 e 250 mg/kg: animais que receberam os respectivos valores de PL. A cada 7 dias, os animais foram pesados. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. Análise de variância (ANOVA) realizado comparando os grupos tratados com o controle.

Figura 6 – Consumo de ração e água de camundongos tratados com diferentes concentrações de PL durante 28 dias



Fonte: autoria própria

Camundongos Swiss ($n = 6$) foram tratados por via oral com diferentes concentrações de proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* durante 28 dias. Controle: animais que receberam salina; 1000, 500 e 250 mg/kg; animais que receberam os respectivos valores de PL. A cada 3 dias, o consumo de água e ração foi registrado. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. Análise de variância (ANOVA) realizado comparando os grupos tratados com o controle.

Não houve mudanças macroscópicas nas estruturas dos órgãos, porém houve aumento significativo no peso do fígado dos animais machos nas dosagens 250 e 500 mg/kg e fêmeas na dose de 250 mg/kg. Houve diminuição no peso dos intestinos nas doses 250 e 500 mg/kg nos machos e na dose de 250 mg/kg nas fêmeas quando comparados ao controle (Tabela 3).

Foram analisadas as microestruturas dos órgãos através de análises histopatológicas para os tratamentos e controle. Não houve alteração como necrose, inflamação

ou fibrose nos órgãos analisados, exceto nos pulmões, onde foi visto uma inflamação nos grupos 250 mg/ kg e 1000 mg/ kg dos machos com focos de pneumonite. Além disso, no grupo de 1000 mg/kg foi visto congestão acentuada no fígado e nos pulmões de machos e fêmeas, além de hiperplasia das Placas de Payer nos machos (Figuras 7, 16). No grupo de 500 mg/kg foi detectado uma degeneração hidrópica nos rins e fígado dos machos e no fígado das fêmeas (Figuras 7, 9, 10). No grupo de 250 mg/kg foi visto uma congestão acentuada no baço e nos pulmões de machos e fêmeas, edema leve no miocárdio; histiocitose no baço e hiperplasia das Placas de Payer no intestino das fêmeas (Figuras 8, 12, 16, 15), os demais órgãos não tiveram diferença em relação ao controle (Figuras 11, 13, 14).

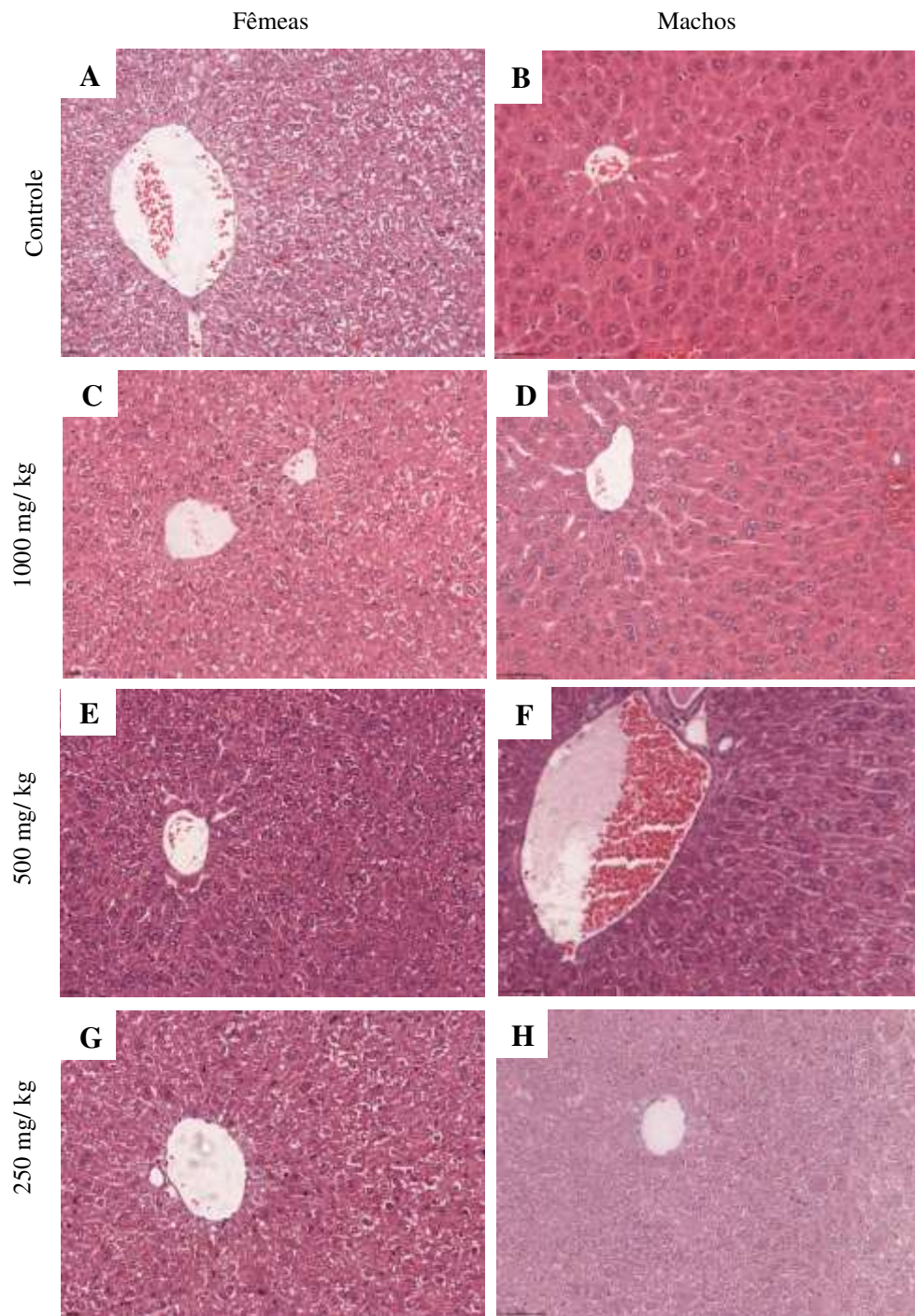
Tabela 3 – Pesos relativos dos órgãos de camundongos tratados via oral com diferentes concentrações de PL

	Controle						1000 mg/ kg					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
Peso corpóreo (g)	26,00	±	0,71	22,29	±	0,68	26,90	±	0,69	22,00	±	0,77
<i>Peso relativo:</i>												
Fígado	44,35	±	1,92	46,78	±	1,15	44,31	±	1,69	46,48	±	1,14
Baço	3,23	±	0,14	3,81	±	0,26	3,39	±	0,34	4,59	±	0,35
Rim direito	7,12	±	0,20	6,15	±	0,35	7,82	±	0,65	5,95	±	0,18
Rim esquerdo	6,79	±	0,21	5,99	±	0,21	7,03	±	0,25	6,02	±	0,12
Timo	1,66	±	0,10	2,31	±	0,10	1,97	±	0,16	2,55	±	0,19
Intestino	53,16	±	2,74	57,86	±	4,50	56,46	±	2,53	59,26	±	3,02
Estômago	8,11	±	0,48	8,52	±	0,17	7,30	±	0,40	9,77	±	0,54
Pâncreas	8,54	±	0,43	7,49	±	0,48	7,80	±	0,64	10,22	±	0,87
Coração	4,10	±	0,07	4,10	±	0,06	4,11	±	0,08	4,17	±	0,08
Pulmões	4,59	±	0,14	5,04	±	0,16	4,49	±	0,20	5,06	±	0,11

	500 mg/kg						250 mg/ kg					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
Peso corpóreo (g)	26,67	±	0,61	23,17	±	0,60	27,67	±	0,61	22,00	±	0,52
<i>Peso relativo:</i>												
Fígado	46,51	±	0,73*	41,40	±	1,09	50,29	±	1,18*	44,59	±	1,97
Baço	3,17	±	0,14	3,49	±	0,14	3,71	±	0,19	3,95	±	0,36
Rim direito	6,94	±	0,13	5,73	±	0,19	6,88	±	0,20	5,88	±	0,23
Rim esquerdo	6,79	±	0,19	5,89	±	0,23	7,30	±	0,10	5,74	±	0,15
Timo	1,65	±	0,13	2,90	±	0,18	1,78	±	0,06	3,01	±	0,23
Intestino	45,98	±	1,59*	50,29	±	0,55	43,89	±	1,88*	54,10	±	2,22*
Estômago	7,67	±	0,23	8,26	±	0,28	8,21	±	0,28	8,62	±	0,49
Pâncreas	7,71	±	0,53	6,82	±	0,46	8,16	±	0,58	8,66	±	0,91
Coração	3,86	±	0,08	4,21	±	0,15	4,05	±	0,10	4,24	±	0,18
Pulmões	4,93	±	0,30	5,80	±	0,60	4,65	±	0,16	4,27	±	0,77

Camundongos Swiss (n = 6) foram tratados por via oral com diferentes concentrações de proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* durante 28 dias. Controle: animais que receberam salina; 1000, 500 e 250 mg/kg: animais que receberam os respectivos valores de PL. No último dia os animais foram eutanasiados e foi realizada necrópsia completa e medição do peso de dez órgãos (fígado, baço, rim direito e esquerdo, timo, intestino, estômago, pâncreas, coração e pulmões). O valor do peso corporal de cada animal foi dividido pelo peso dos respectivos órgãos para obter a razão de peso corpo/ órgão. Valores expressos como média ± erro padrão. Análise de variância (ANOVA) realizado comparando os grupos tratados com o controle. * diferença estatística com p < 0,05.

Figura 7 – Cortes histológicos dos tecidos do fígado de camundongos tratados via oral com PL

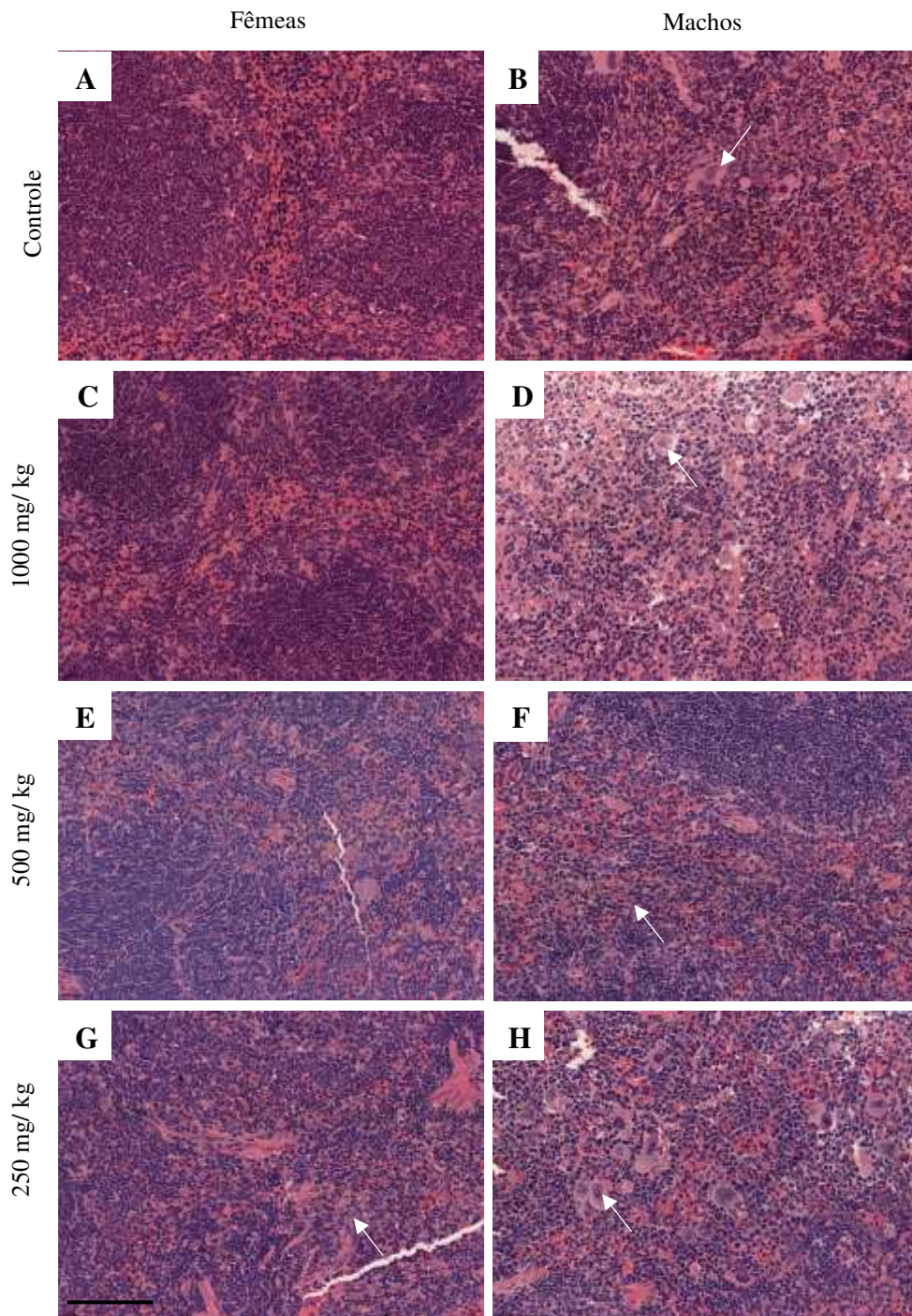


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do fígado de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μm .

Figura 8 – Cortes histológicos dos tecidos do baço de camundongos tratados via oral com PL

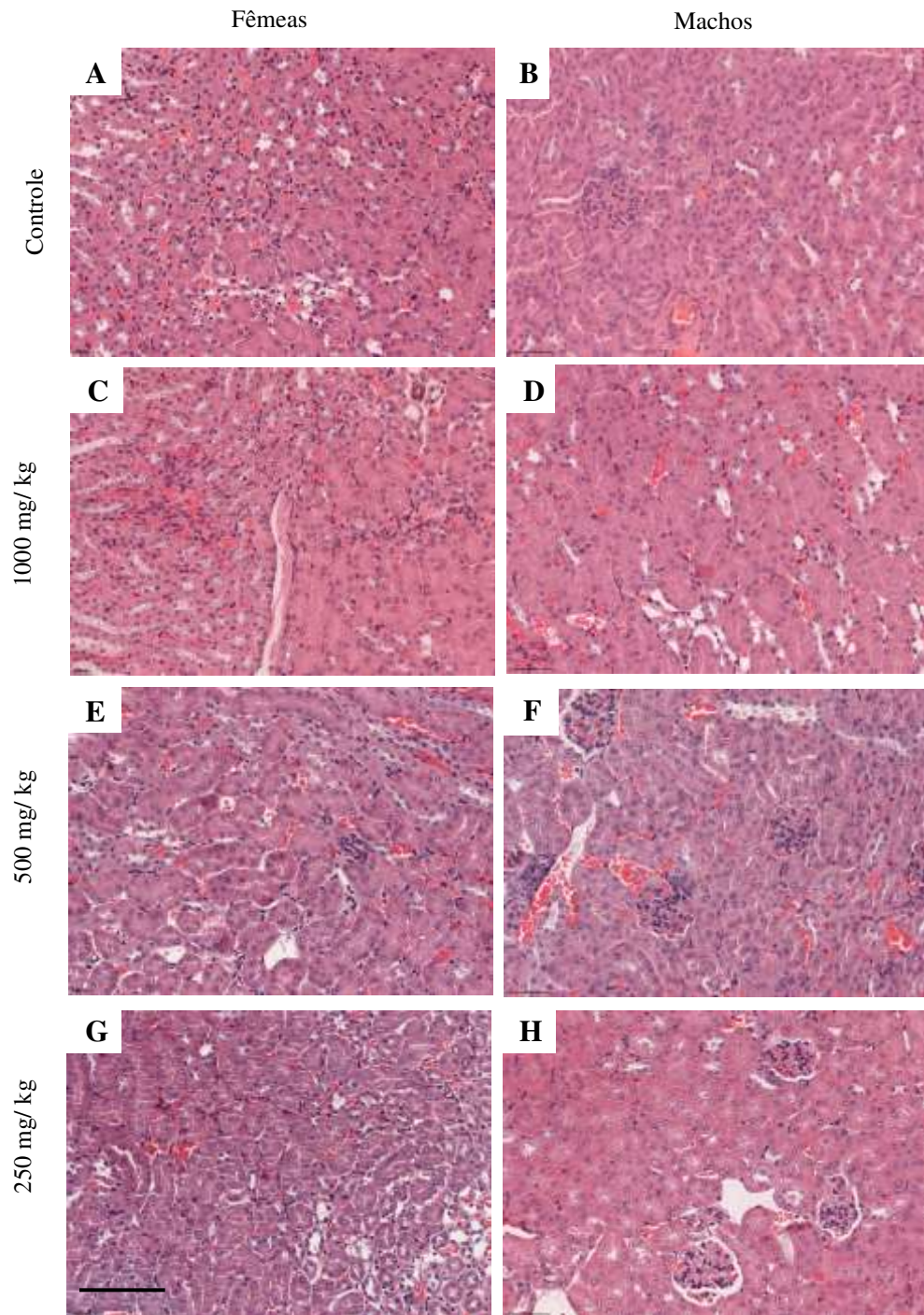


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do baço de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos). Histiocitose (B, D, F, G, H, setas brancas).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Figura 9 – Cortes histológicos dos tecidos do rim direito de camundongos tratados via oral com PL

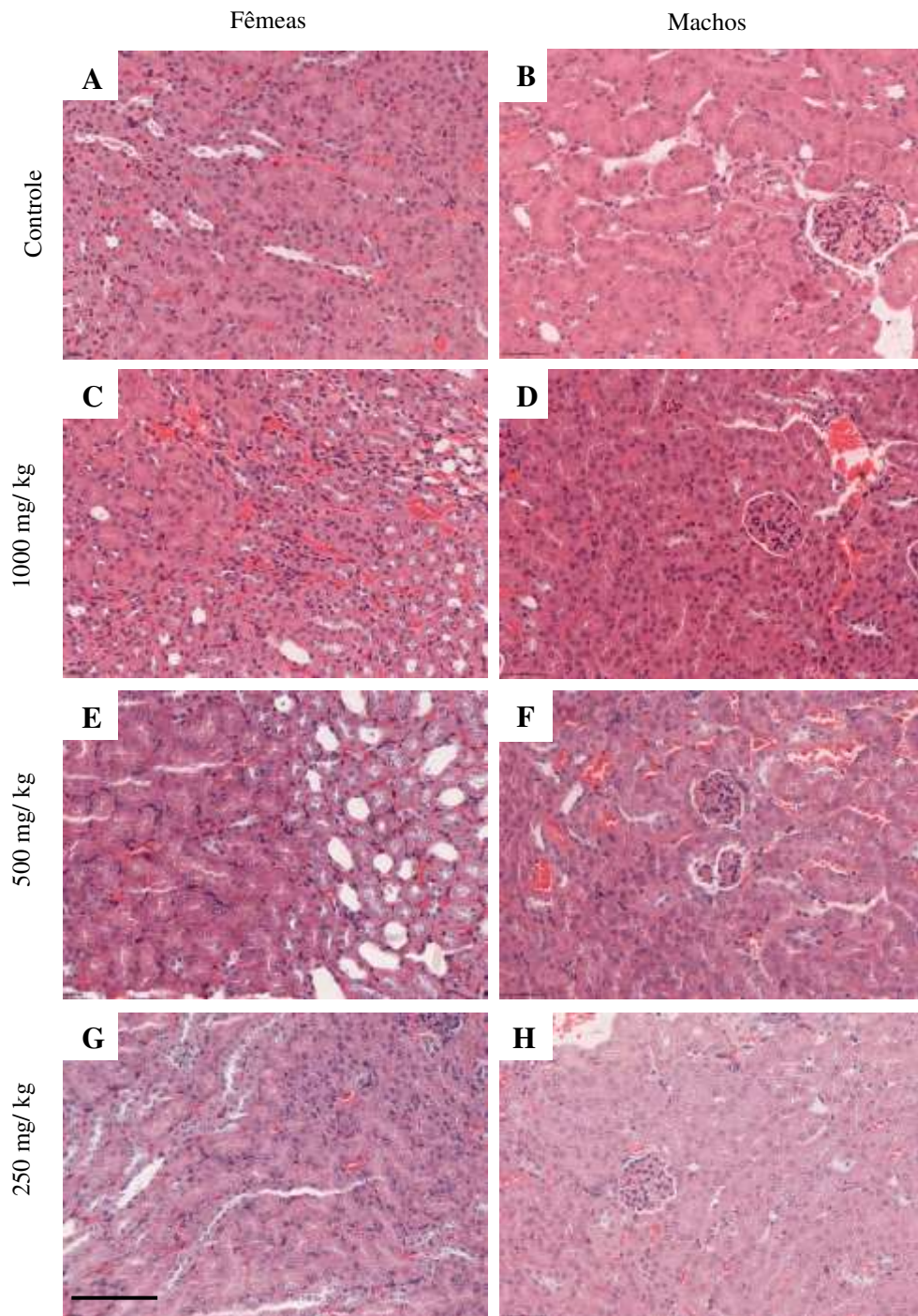


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do rim direito de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E -fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Figura 10 – Cortes histológicos dos tecidos do rim esquerdo de camundongos tratados via oral com PL

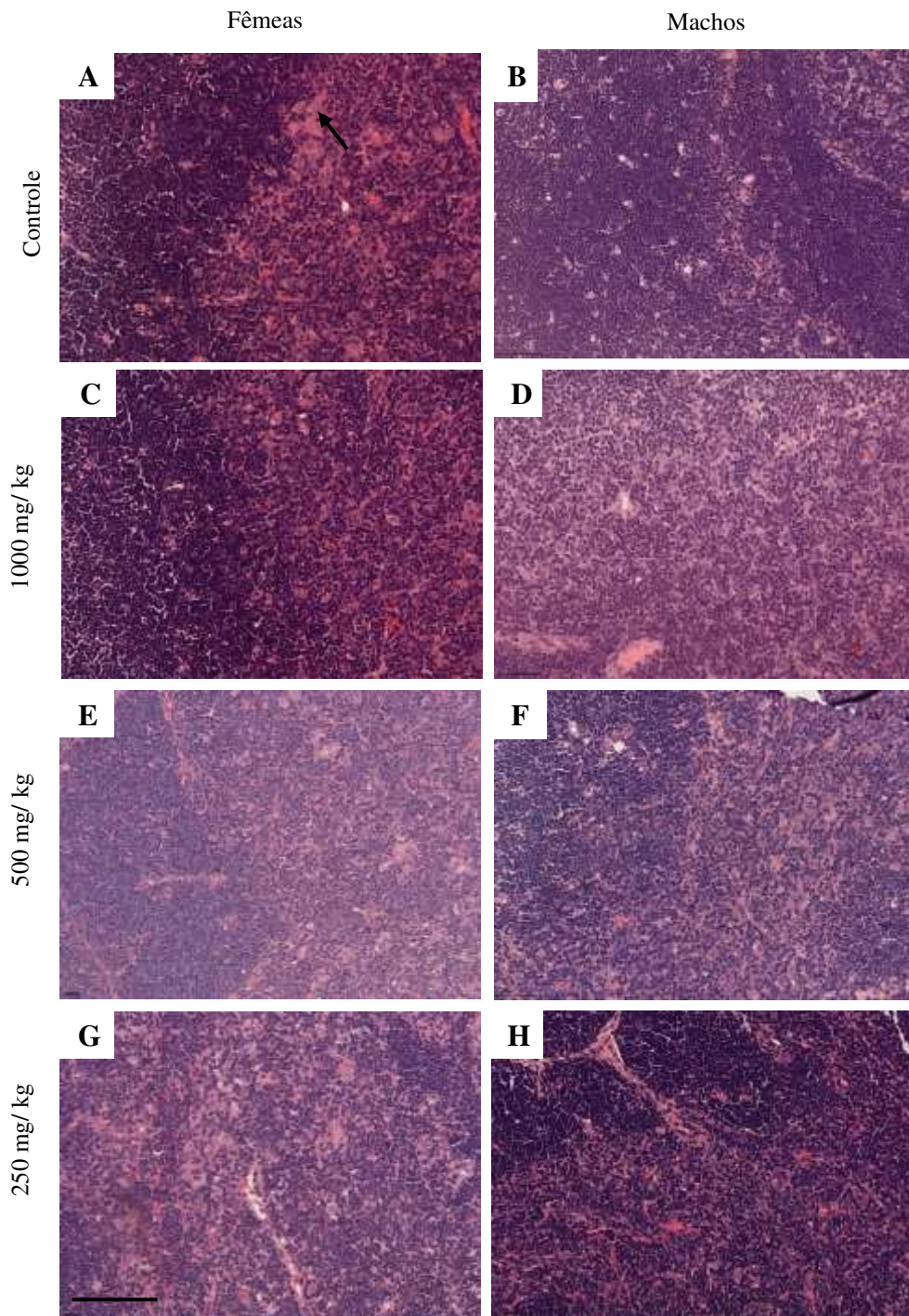


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do rim esquerdo de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E -fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

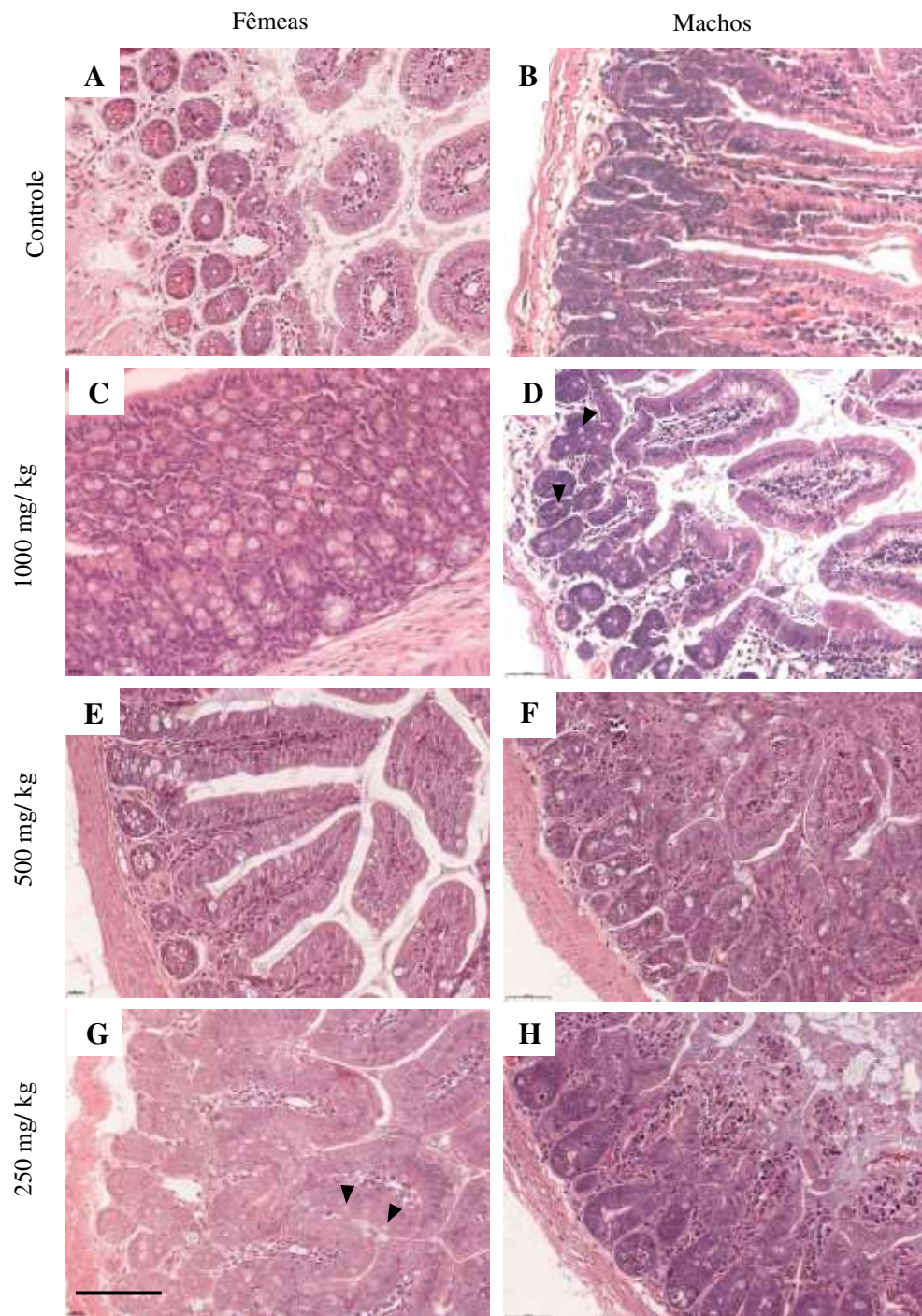
Figura 11 – Cortes histológicos dos tecidos do timo de camundongos tratados via oral com PL



Fonte: autoria própria.

Histopatologia do timo de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos). Hiperplasia linfocitária (A, seta preta). Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Figura 12 – Cortes histológicos dos tecidos do intestino de camundongos tratados via oral com PL

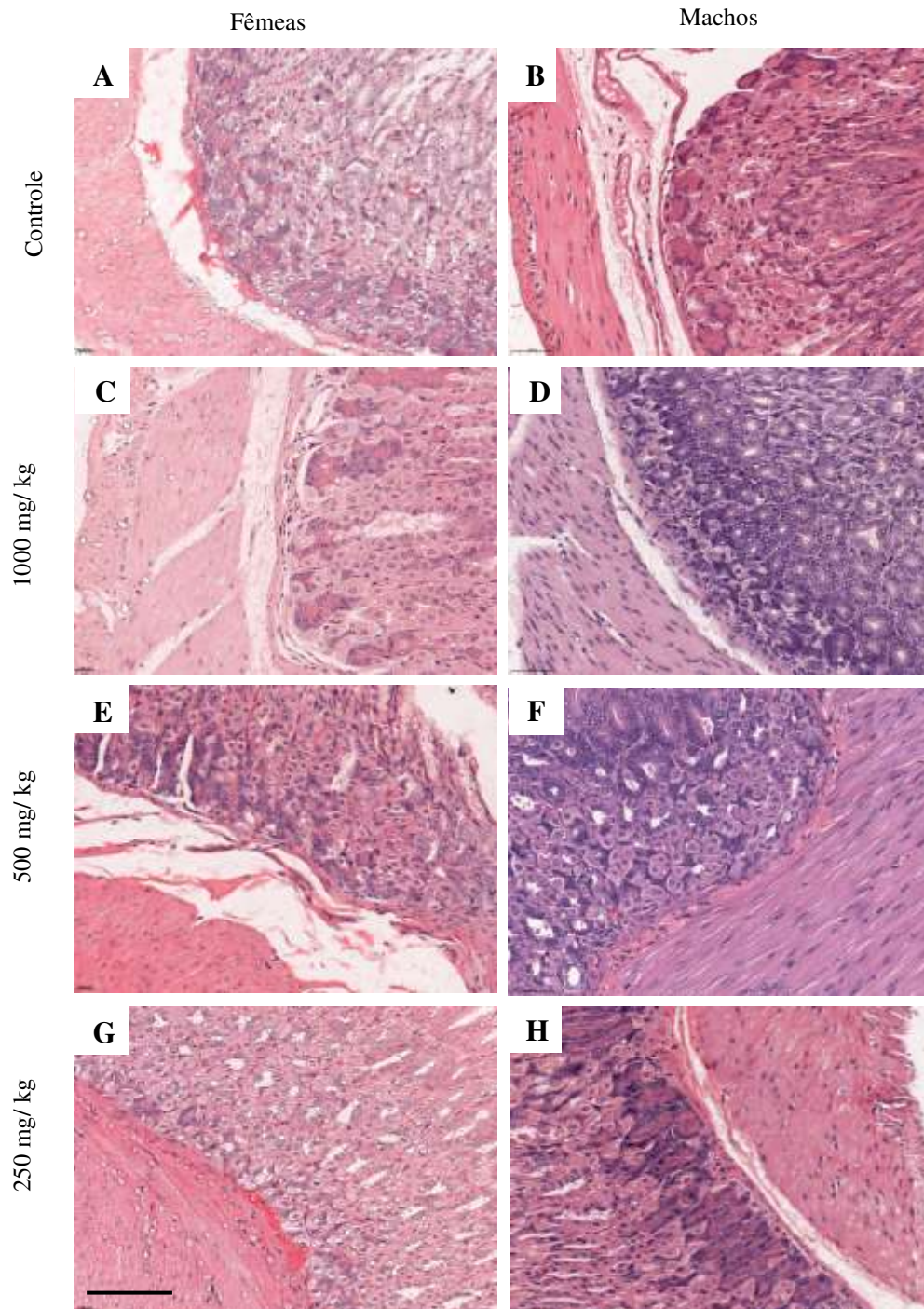


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do intestino de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E -fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos). Hiperplasia das placas de payer (D e G, cabeça de seta preta).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Figura 13 – Cortes histológicos dos tecidos do estômago de camundongos tratados via oral com PL

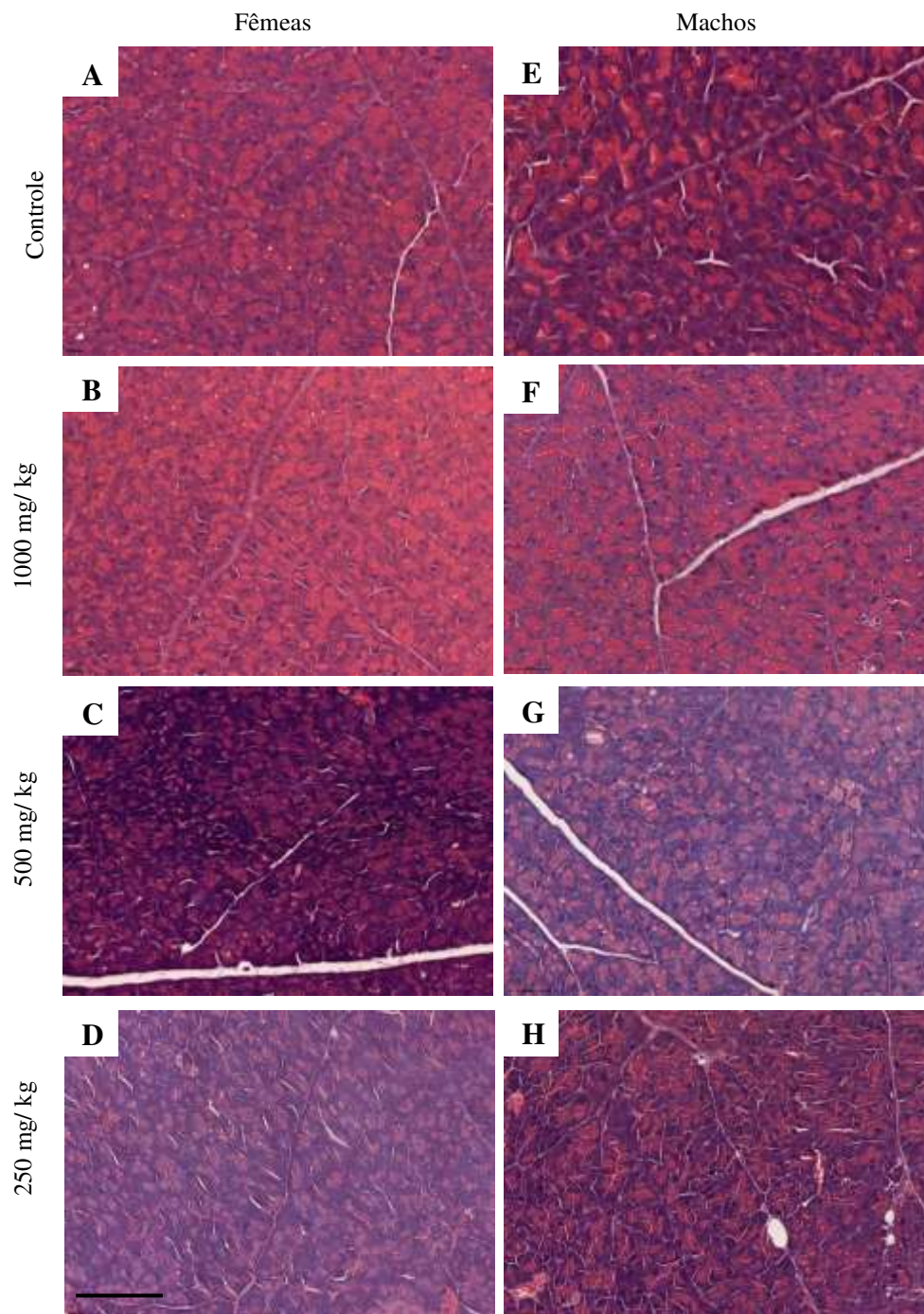


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do estômago de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Figura 14 – Cortes histológicos dos tecidos do pâncreas de camundongos tratados via oral com PL

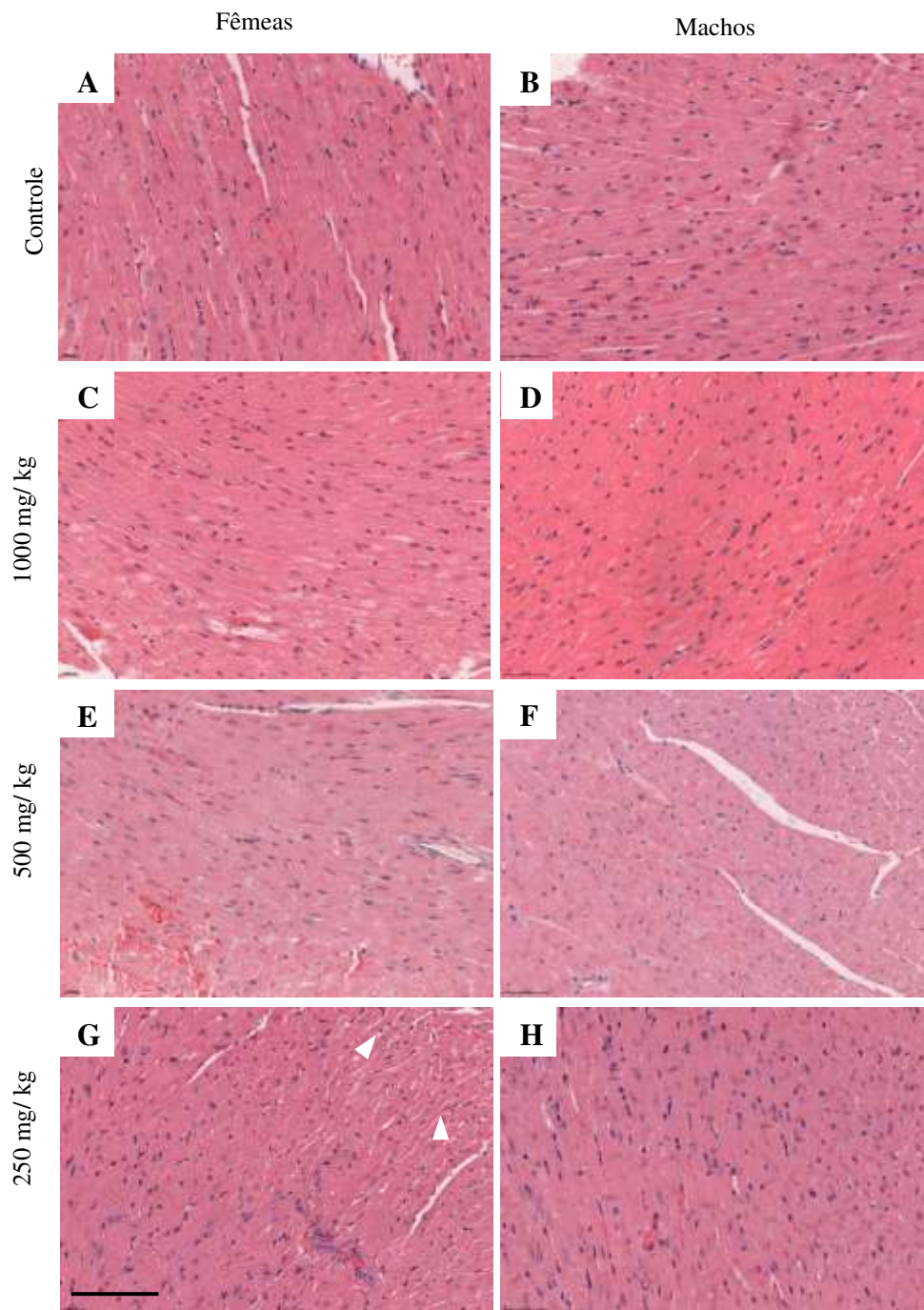


Fonte: autoria própria.

Histopatologia do pâncreas de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F - machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μm.

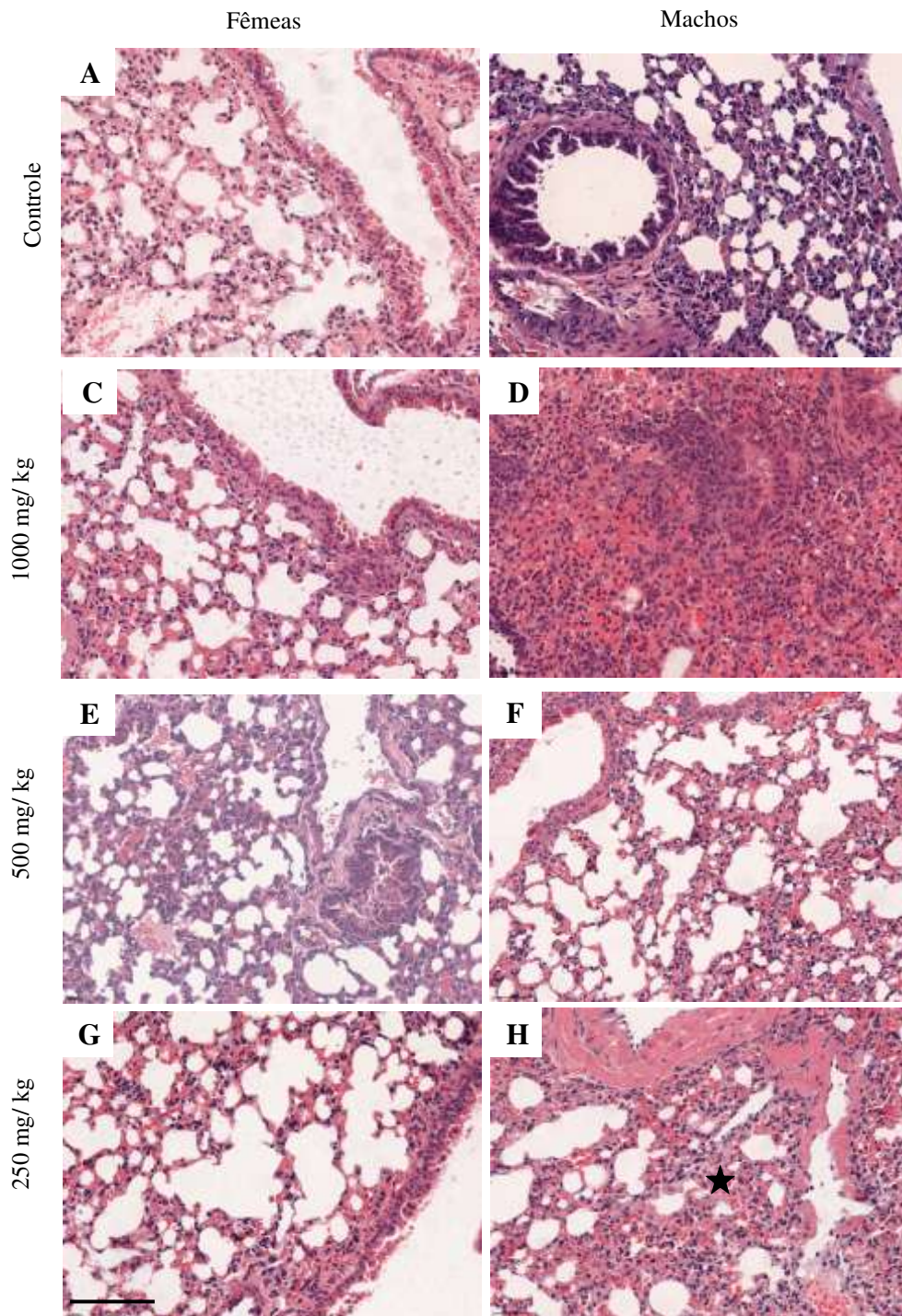
Figura 15 – Cortes histológicos dos tecidos do coração de camundongos tratados via oral com PL



Fonte: autoria própria.

Histopatologia do coração de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F- machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos). Edema (G, cabeça de seta branca). Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Figura 16 – Cortes histológicos dos tecidos dos pulmões de camundongos tratados via oral com PL



Fonte: autoria própria.

Histopatologia dos pulmões de animais tratados via oral, grupo Controle (A - fêmeas e B - machos) e proteínas do látex PL nas concentrações: 1000 mg/ kg (C - fêmeas e D - machos); 500 mg/ kg (E - fêmeas e F - machos) e 250 mg/ kg (G - fêmeas e H - machos). Pneumonite (H, estrela preta).

Todas as imagens estão na mesma escala, a barra preta no canto inferior esquerdo representa 250 μ m.

Para os parâmetros hematológicos foi avaliada a quantidade de leucócitos totais, linfócitos totais, percentual de linfócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e plaquetas; o número de plaquetas aumentou significativamente nos grupos 1000, 500 e 250 mg/ kg quando comparado ao controle (Tabela 4).

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados acerca dos seguintes parâmetros: aspartato aminotransferase (AST, U/ L), alanina aminotransferase (ALT, U/ L), colesterol (mg/ dL), ureia (mg/ dL), albumina (g/ dL), proteínas totais (g/ dL), fosfatase alcalina (U/ L), creatinina (mg/ dL), ácido úrico (mg/ dL) e glicemia (mg/ dL). Os níveis de fosfatase alcalina dos animais machos 500 mg/kg foram significativamente maiores do que o controle. Enquanto os níveis de ácido úrico das fêmeas dos grupos 500 mg/kg e 250 mg/kg foram significativamente menores quando comparados ao controle (Tabela 5).

Tabela 4 – Análise hematológica de animais tratados via oral com diferentes concentrações de PL

	Controle						1000 mg/ kg					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
WBC	6,17	±	0,95	6,88	±	0,58	5,21	±	0,54	8,83	±	1,47
LYM	4,30	±	1,05	5,75	±	0,63	2,56	±	0,51	8,01	±	1,46
LY%	67,26	±	9,40	83,01	±	3,31	48,57	±	8,06	90,18	±	2,52
RBC	7,34	±	0,52	8,59	±	0,22	7,88	±	0,32	8,69	±	0,32
HGB	11,59	±	1,06	13,73	±	0,32	12,16	±	0,68	13,30	±	0,47
HCT	34,95	±	2,38	40,95	±	1,16	35,35	±	1,88	42,74	±	1,41
MCV	47,60	±	0,59	47,67	±	0,59	44,74	±	0,82	49,25	±	0,25
MCHC	31,17	±	0,52	33,59	±	1,12	33,79	±	0,51	31,08	±	0,11
PLT	761,00	±	103,28	637,00	±	93,84	933,86	±	20,76*	952,75	±	20,30*

	500 mg/ kg						250 mg/ kg					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
WBC	7,38	±	0,61	5,28	±	1,00	5,63	±	0,55	4,76	±	0,51
LYM	3,29	±	0,30	4,58	±	0,83	2,61	±	0,33	3,90	±	0,41
LY%	44,67	±	2,81	87,00	±	1,55	47,67	±	5,74	82,00	±	1,64
RBC	8,54	±	0,17	8,49	±	0,22	8,00	±	0,05	8,33	±	0,19
HGB	13,17	±	0,40	14,20	±	0,41	12,42	±	0,37	13,00	±	0,35
HCT	38,17	±	0,79	39,40	±	0,93	35,83	±	0,54	37,40	±	0,93
MCV	44,67	±	0,44	46,42	±	0,86	44,75	±	0,49	44,84	±	0,10
MCHC	34,42	±	0,46	36,00	±	0,59	34,55	±	0,56	34,72	±	0,16
PLT	1018,50	±	27,50*	498,40	±	47,02*	940,00	±	66,58*	717,20	±	66,21*

Camundongos Swiss (n = 6) foram tratados por via oral com diferentes concentrações de proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* durante 28 dias. Controle: animais que receberam salina; 1000, 500 e 250 mg/kg: animais que receberam os respectivos valores de PL No último dia, amostras de sangue foram coletadas em tubos com anticoagulante e levados para analisador hematológico semiautomático para análise dos seguintes parâmetros:

WBC: leucócitos totais (10^9 células/ L), LYM: linfócitos totais (10^9 células/ L), LY%: percentual de linfócitos, RBC: eritrócitos (10^{12} células/ L), HGB: hemoglobina (g / dL), HCT: hematócrito (%), MCV: volume corpuscular médio (fL), MCHC: hemoglobina corpuscular média (g /dL), PLT: plaquetas (10^9 células/ L). Valores expressos como média ± erro padrão. Análise de variância (ANOVA) realizado comparando os grupos tratados com o controle. * diferença estatística com $p < 0,05$.

Tabela 5 – Análise dos parâmetros bioquímicos de animais tratados via oral com diferentes concentrações de PL

	Controle						1000 mg/ kg					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
AST	184,1	±	14,49	252,6	±	13,70	182,6	±	24,16	206,00	±	13,84
ALT	77,27	±	7,94	72,94	±	14,64	106,60	±	19,93	69,02	±	9,61
Colesterol	161,50	±	4,50	119,8	±	6,12	148,90	±	4,56	116,00	±	4,71
Ureia	53,16	±	3,39	46,32	±	1,91	47,89	±	2,68	35,86	±	5,06
Albumina	1,74	±	0,05	2,13	±	0,03	1,66	±	0,06	2,23	±	0,06
Proteínas Totais	4,85	±	0,10	4,71	±	0,10	4,53	±	0,08	4,92	±	0,29
Fosfatase Alcalina	56,14	±	2,06	53,31	±	2,28	52,21	±	2,63	49,00	±	2,21
Creatinina	3,91	±	0,47	3,29	±	0,49	3,86	±	1,01	4,32	±	0,30
Ácido Úrico	1,28	±	0,15	1,29	±	0,24	1,20	±	0,12	1,05	±	0,08
Glicemia	149,80	±	7,48	141,30	±	8,02	160,00	±	4,83	135,00	±	9,61

	500 mg/ kg						250 mg/ kg					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
AST	256,4	±	34,33	216,30	±	33,27	236,40	±	52,49	275,80	±	51,00
ALT	57,69	±	4,37	115,90	±	27,0	84,89	±	9,52	81,90	±	20,21
Colesterol	156,50	±	8,57	121,40	±	7,18	167,70	±	5,34	120,60	±	6,81
Ureia	53,83	±	9,65	45,03	±	4,19	54,44	±	9,57	42,16	±	3,51
Albumina	1,95	±	0,03	2,12	±	0,05	1,85	±	0,06	2,10	±	0,07
Proteínas Totais	4,64	±	0,11	4,72	±	0,09	5,03	±	0,15	4,76	±	0,06
Fosfatase Alcalina	66,11	±	1,61*	58,32	±	3,19	59,66	±	1,49	45,15	±	3,19
Creatinina	2,51	±	0,63	2,10	±	0,67	3,69	±	0,58	2,90	±	0,40
Ácido Úrico	1,27	±	0,22	0,76	±	0,08*	1,57	±	0,27	0,74	±	0,05*
Glicemia	148,30	±	6,87	145,30	±	2,99	171,50	±	7,58	154,30	±	4,19

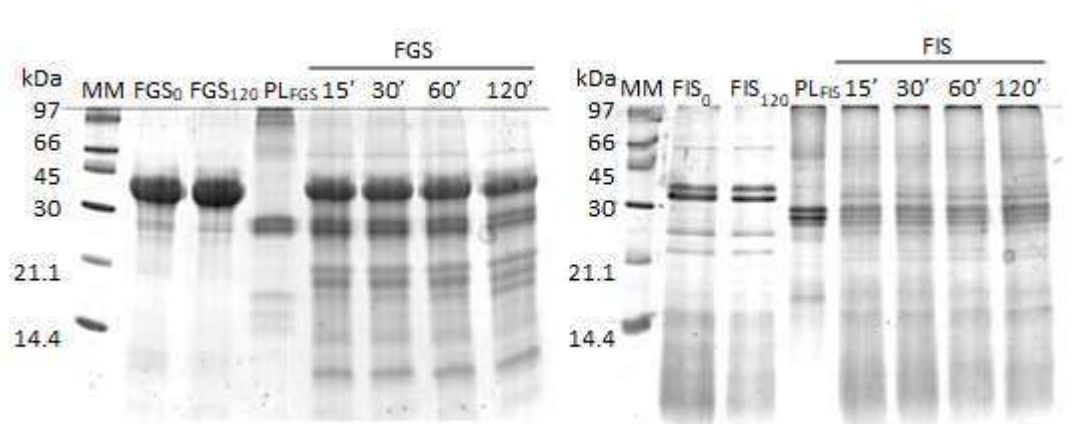
Camundongos Swiss (n = 6) foram tratados por via oral com diferentes concentrações de proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* durante 28 dias. No último dia do tratamento, amostras de sangue foram coletados sem anticoagulante e em seguida centrifugadas para separação do soro. Os parâmetros clínicos mensurados incluem: aspartato aminotransferase (AST, U/ L), alanina aminotransferase (ALT, U/ L), colesterol (mg/ dL), ureia (mg/ dL), albumina (g/ dL), proteínas totais (g/ dL), fosfatase alcalina (U/ L), creatinina (mg/ dL), ácido úrico (mg/ dL), glicemia (mg/ dL). Valores expressos como média ± erro padrão. Análise de variância (ANOVA) realizado comparando os grupos tratados com o controle. * diferença estatística com p < 0,05.

4.3 Digestibilidade *in vitro*

4.3.1 Não Sequencial

Para avaliar o perfil das proteínas quando submetidas a enzimas gastrointestinais, foi realizada digestibilidade *in vitro* não sequencial, na qual foi utilizada pepsina para simular o fluido gástrico (FGS) e pancreatina para simular o fluido intestinal (FIS). Houve uma discreta alteração no perfil de PL quando submetido aos fluidos simulados, sugerindo uma limitada degradação, o que resultou em um perfil constante durante os 120 minutos de análise.

Figura 17 – Digestibilidade *in vitro* das proteínas do látex em fluido intestinal e gástrico simulados



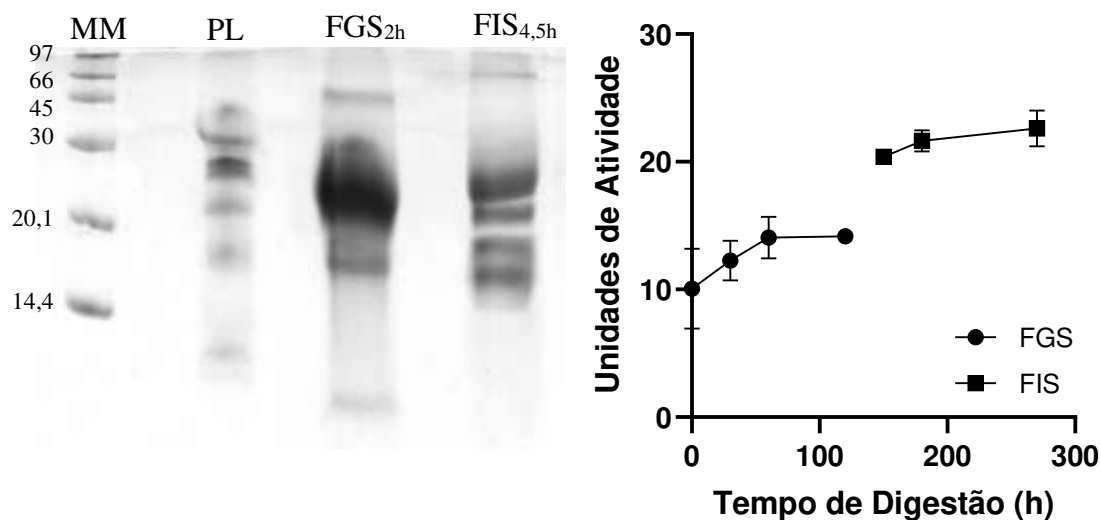
Fonte: autoria própria

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e tricina (Tricine SDS-PAGE) das proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* após digestão *in vitro* em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS), por 15 a 120 minutos. Após a digestão as amostras foram preparadas com β -mercaptoetanol e aplicadas em gel de poliacrilamida 17,5%. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Coloidal G-250.

4.3.2 Sequencial

A fim de simular o processo de digestibilidade *in vivo*, foi avaliado o perfil das proteínas quando submetidas a digestibilidade *in vitro* de maneira sequencial, na qual foi utilizada pepsina para simular o fluido gástrico (FGS) e tripsina para simular o fluido intestinal (FIS). Concomitantemente, foi realizado o acompanhamento da atividade proteolítica. Foi observado um perfil de degradação reduzido na digestão de PL entre os FGS e FIS, porém a atividade proteolítica permaneceu estável durante o processo de 4,5 horas.

Figura 18 – Digestibilidade sequencial das proteínas do látex em fluido gástrico e intestinal simulados e atividade proteolítica durante digestão



Fonte: autoria própria

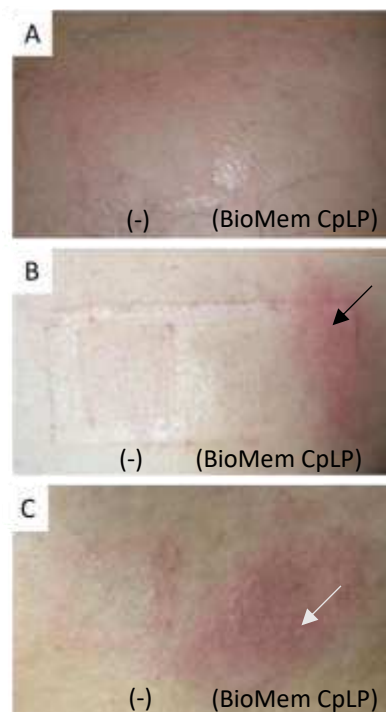
Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e tricina (Tricine SDS-PAGE) das proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* após digestão sequenciada *in vitro* em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS) por 2 horas e 4 horas e 30 minutos. Após a digestão as amostras foram preparadas com β -mercaptoetanol e aplicadas em gel de poliacrilamida 17,5%. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Coloidal G-250. À direita, representado em gráfico, o acompanhamento da atividade proteolítica de PL durante o ensaio de digestibilidade.

4.4 Alergenicidade por teste de contato

Para estudar o potencial clínico de sensibilidade cutânea da biomembrana composta de proteínas do látex de *C. procera* (BioMem CpLP), foi realizado um teste de contato que ocorreu em duas fases. A primeira foi de indução, a qual foi realizada com a participação de 52 voluntários, 26 homens, de 18 a 44 anos, e 26 mulheres, de 19 a 51 anos. Em seguida, 43 voluntários seguiram para a fase desafio (APÊNDICE E).

Os participantes de número 4 e 23 foram retirados da pesquisa devido a faltas continuadas, comprometendo o protocolo e a avaliação. Os voluntários 9, 11, 13, 45 e 46 foram retirados devido a desconforto nos primeiros dias de experimento, relatados como prurido, ardência e vermelhidão no local de contato (Figura 19). O voluntário 23 não iniciou o experimento. O voluntário 37 foi retirado devido a crise de rinite e uso de medicamentos que interfeririam na interpretação do resultado (APÊNDICE F).

Figura 19 – Fotografia representativa dos voluntários que sentiram desconforto na primeira fase do teste de alergenicidade por contato



Fonte: autoria própria.

Fotografia do dorso direito dos voluntários que foram retirados da pesquisa por sentirem desconforto durante a primeira fase do teste, onde foram aplicadas biomembrana de PL (BioMem CpLP) por 3 semanas com leituras feitas a cada 2 dias: A- segunda leitura, voluntário 9; B- terceira leitura, voluntário 13; C- segunda leitura, voluntário 46. Ao lado esquerdo das imagens, resultado do controle negativo e ao lado direito, resultado do contato com a BioMem CpLP. Seta preta: eritema nítido; Seta branca: eritema leve.

Na fase de indução, 6 voluntários, identificados pelos números 2, 7, 8, 11, 13 e 40 (12%), testaram positivo para alergenicidade, representado na figura (Figura 20), enquanto na segunda fase, 2 voluntários, 2 e 36 (5%), testaram positivos para alergenicidade, representado na figura (Figura 21). Os demais voluntários testaram negativos para alergenicidade na primeira e segunda fases, sendo representados pelos voluntários 44, 47 e 48 nas imagens (Figuras 22, 23, 24).

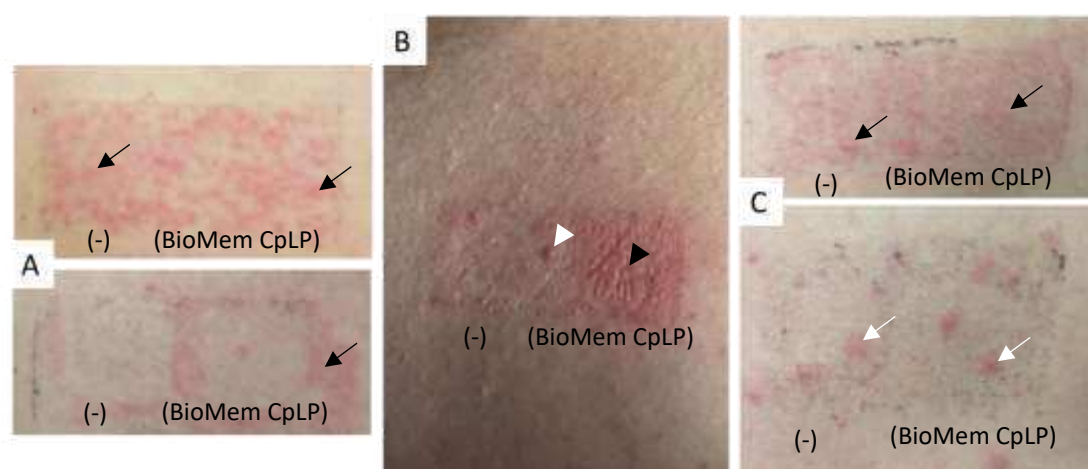
Na primeira fase, dos voluntários que testaram positivo, 4 não possuíam doenças preexistentes (67%) e 2 voluntários relataram ter rinite (33%); 2 voluntários possuíam o fototipo II (33%), 3 voluntários possuíam fototipo III (50%) e 1 voluntário possuía o fototipo IV (17%); 3 voluntários eram homens (50%) e 3 voluntários eram mulheres (50%).

Na segunda fase, dos voluntários que testaram positivos, 1 voluntário não possuía doença preexistente (50%) e 1 relatou ter rinite (50%); 1 voluntário possuía o fototipo III (50%)

e 1 o fototipo IV (50%); 1 voluntário era homem (50%) e 1 era mulher (50%) (Tabela 6 e APÊNDICE F).

Com exceção dos voluntários 10 e 42, os demais participantes que iniciaram o experimento sentiram prurido de leve a intenso no local.

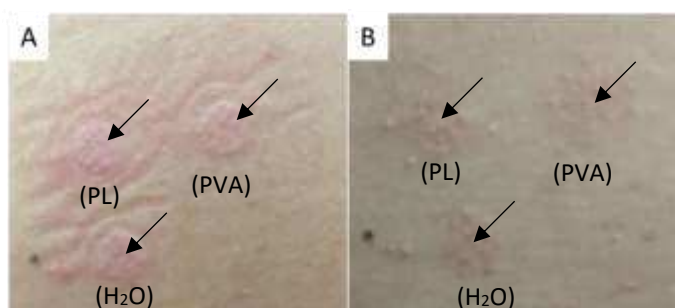
Figura 20 – Fotografia representativa dos voluntários que testaram positivo na primeira fase do teste de contato



Fonte: autoria própria.

Fotografia do dorso direito dos voluntários que testaram positivo na primeira fase do teste, onde foram aplicadas biomembrana de PL (BioMem CpLP) por 3 semanas com leituras feitas a cada 2 dias. A- segunda e sétima leitura, voluntário 7; B- terceira leitura, voluntário 8; C- primeira e terceira leitura, voluntário 40. Ao lado esquerdo das imagens, resultado do controle negativo e ao lado direito resultado do contato com a BioMem CpLP. Seta preta: eritema nítido; Seta branca: petéquias; Cabeça de seta preta: edema; Cabeça de seta branca: pápula.

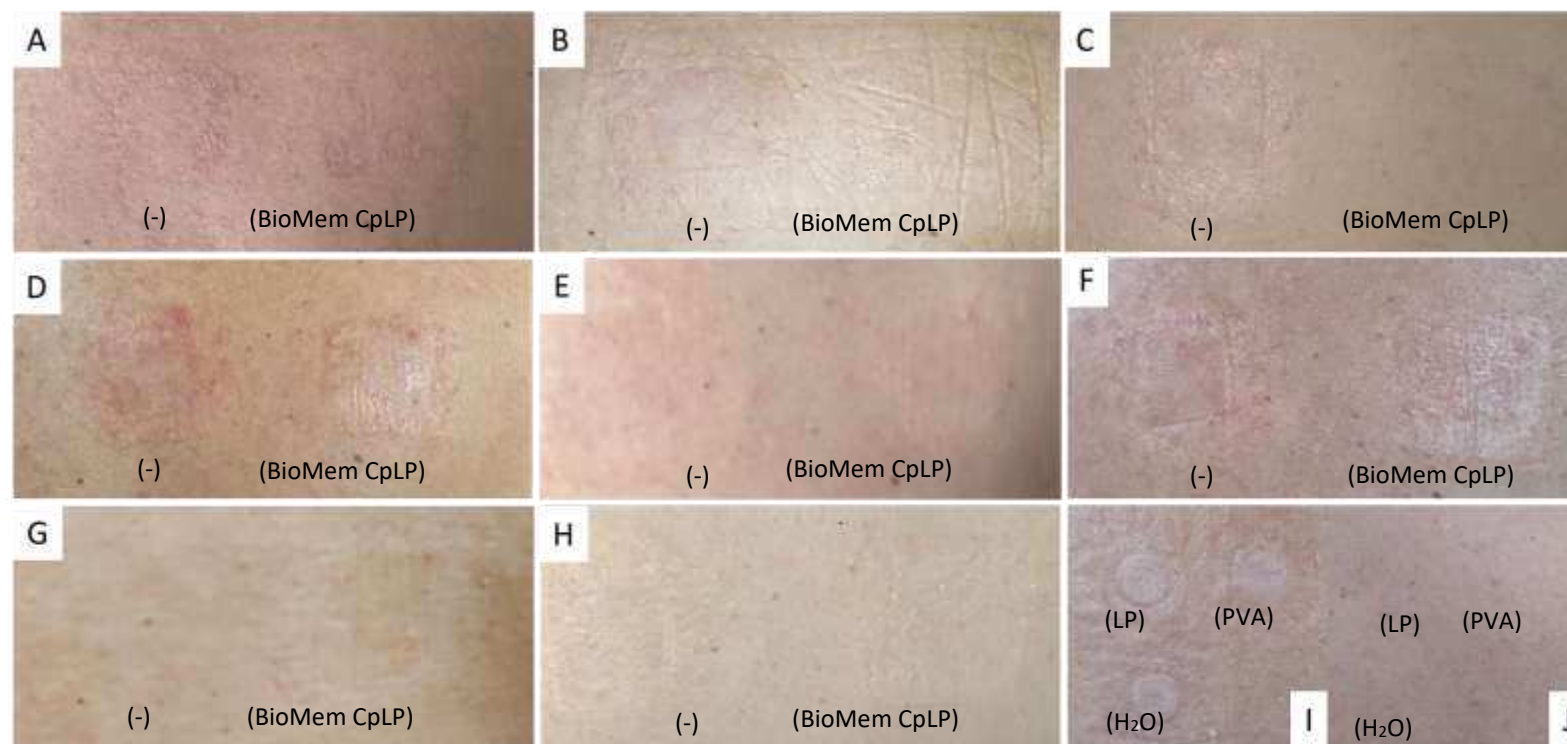
Figura 21 – Fotografia representativa do voluntário 36, positivo na segunda fase do teste de contato



Fonte: autoria própria.

Fotografia do dorso esquerdo do voluntário 36 que testou positivo na segunda fase do teste, onde foi aplicado câmaras adesivas para teste de contato contendo, PL, PVA e H₂O; foram realizadas leituras das reações adversas após 48h e 72h. A- leitura de 48h; B- leitura de 72h. Seta preta: eritema nítido.

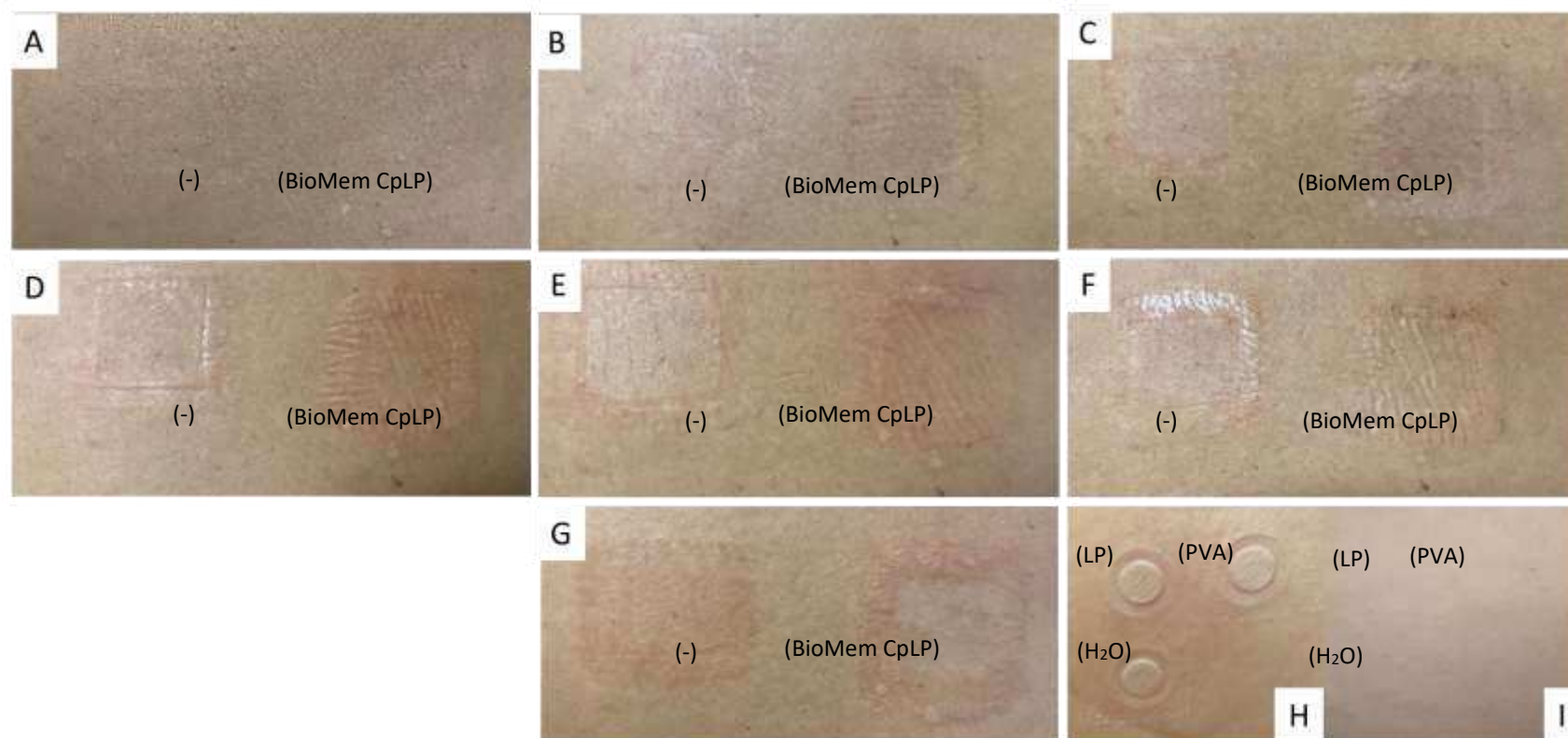
Figura 22 – Fotografia do voluntário 44, negativo na primeira e segunda fase do teste de contato



Fonte: autoria própria.

Fotografia do dorso do voluntário 44 que testou negativo na primeira e segunda fases do teste de contato; (A - H) – Primeira fase, lado esquerdo das imagens, controle negativo e lado direito, BioMem CpLP: A- primeira leitura; B- segunda leitura; C- terceira leitura; D- quarta leitura; E- quinta leitura; F- sexta leitura; G- sétima leitura; H- oitava leitura; (I - J) – Segunda fase do teste de contato contendo PL, PVA e H₂O: I- leitura de 48h; J- leitura de 72h.

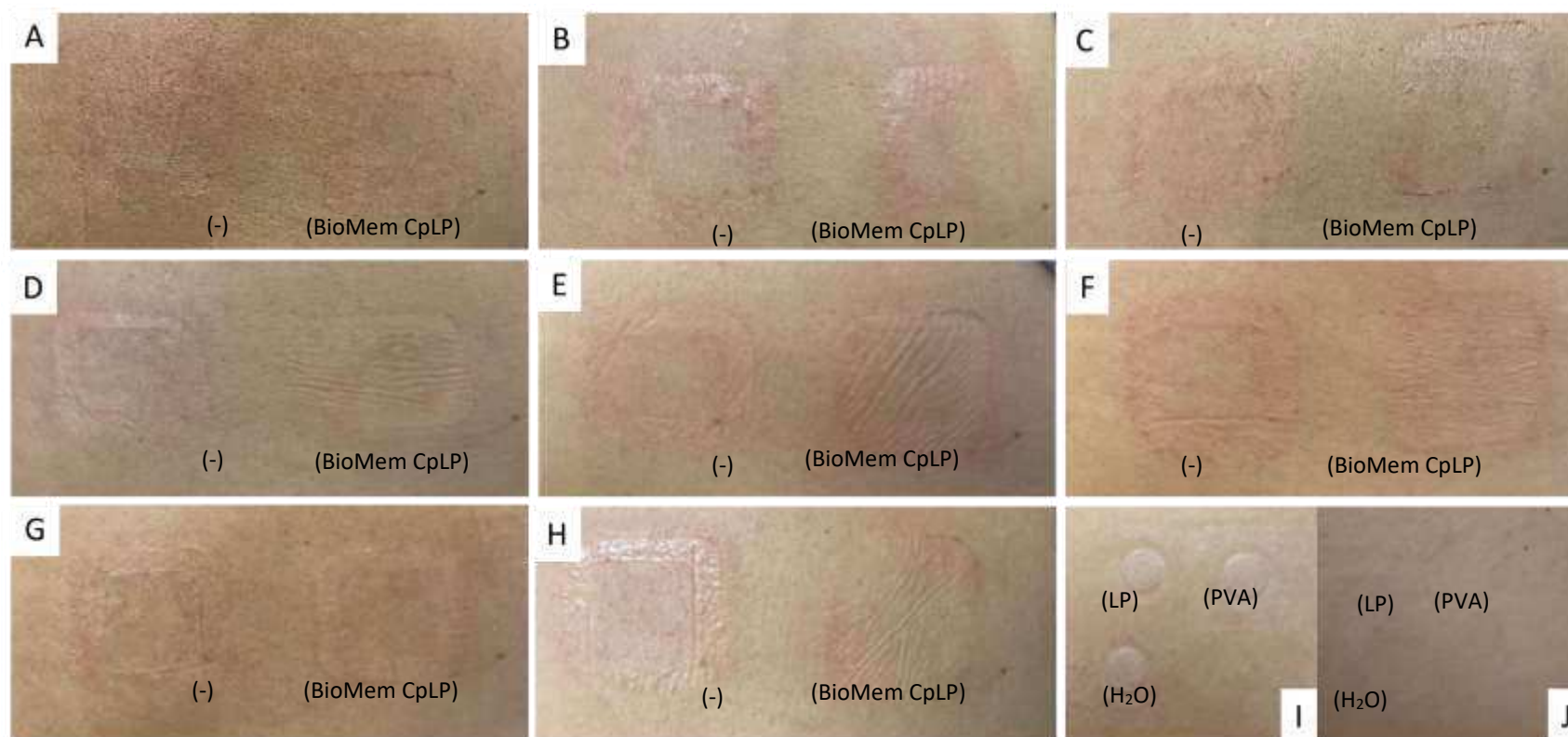
Figura 23– Fotografia do voluntário 47, negativo na primeira e segunda fase do teste de alergenicidade por contato



Fonte: autoria própria.

Fotografia do dorso do voluntário 44 que testou negativo na primeira e segunda fases do teste de contato; (A - H) – Primeira fase, lado esquerdo das imagens controle negativo e lado direito BioMem CpLP: A- primeira leitura; B- segunda leitura; C- terceira leitura; D- quarta leitura; E- quinta leitura; F- sexta leitura; G - oitava leitura; (H - I) – Segunda fase do teste de contato contendo PL, PVA e H₂O: H - leitura de 48h; I- leitura de 72h.

Figura 24 – Fotografia do voluntário 48, negativo na primeira e segunda fase do teste de alergenicidade por contato



Fonte: autoria própria.

Fotografia do dorso do voluntário 44 que testou negativo na primeira e segunda fases do teste de contato; (A - H) – Primeira fase, lado esquerdo das imagens controle negativo e lado direito BioMem CpLP: A- primeira leitura; B- segunda leitura; C- terceira leitura; D- quarta leitura; E- quinta leitura; F- sexta leitura; G- sétima leitura; H- oitava leitura; (I - J) – Segunda fase do teste de contato contendo PL, PVA e H₂O: I- leitura de 48h; J- leitura de 72h.

Tabela 6 – Resultado do teste de contato em 52 voluntários testados com PL

		Doença preexistente				Fototipo								Sexo				Total	
		Ausente		Presente		I		II		III		IV		M		F			
		v	%	v	%	v	%	v	%	v	%	v	%	v	%	v	%	v	%
Fase 1	Positivo	4	67	2	33	0	0	2	33	3	50	1	17	3	50	3	50	6	12
	Negativo	31	67	15	33	3	7	12	26	14	30	16	35	22	48	24	52	46	88
Fase 2	Positivo	1	50	1	50	0	0	0	0	1	50	1	50	1	50	1	50	2	5
	Negativo	24	59	17	41	3	7	12	29	14	34	13	32	21	51	20	49	41	95

Fonte: autoria própria

v: frequência absoluta

%; percentual relativo

Foi realizado teste exato de Fischer e chi-quadrado para avaliar a possível relação entre resultados de cada fase e a frequência de características dos voluntários. Em todas as comparações o valor de p foi igual a 1.

5 DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que a fração PL de *Calotropis procera* não é tóxica para uso contínuo oral, visto que não houve alterações significativas em diversos marcadores de toxicidade em camundongos tratados com PL, mesmo nas doses mais elevadas. Junto com trabalhos anteriores que classificam PL como substância de categoria 5, com DL50 acima de 5000 mg/kg (Bezerra et al, 2017), pode ser concluído que PL, quando administrado por via oral em doses repetidas, não é tóxica e pode ser utilizada em formulações orais.

Neste estudo de toxicidade oral subaguda por 28 dias, seguiu-se as recomendações do guia OECD 407 em camundongos Swiss machos e fêmeas. A análise dos sinais clínicos é importante na avaliação toxicológica (Stevens, 1994), morbidez e mortalidade foram verificadas diariamente neste estudo. PL não produziu alterações no consumo de comida e água, revelando não possuir efeitos adversos nos processos metabólicos básicos dos animais testados.

O sistema hematopoiético funciona como alvo de compostos tóxicos e é um indicador dinâmico para condições patológicas (Ozarde; Choudhari, 2022). Neste estudo, o tratamento com PL não produziu alterações hematológicas (eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito etc.), o que indica que PL não afeta as células sanguíneas nem sua produção. Dados bioquímicos e hematológicos são de grande importância para a determinação da toxicidade induzida por drogas (Restell et al., 2014).

As transaminases (AST e ALT) são bons indicadores de função hepática e biomarcadores de toxicidade de drogas (Sarkodie et al., 2022). Qualquer alteração nessas enzimas pode indicar seu efluxo para a corrente sanguínea devido ao dano nas células parenquimatosas do fígado. Neste estudo não houve mudanças nos níveis de AST e ALT, o que revela que PL não afetou o funcionamento e metabolismo do fígado. Apesar de ser relatado neste estudo anormalidades na função renal (diferenças significativas na fosfatase alcalina e ácido úrico de animais tratados), os níveis desses parâmetros alterados permaneceram dentro da normalidade para camundongos Swiss (Restell et al., 2014).

As análises histopatológicas fornecem evidências para as observações bioquímicas e hematológicas (Matsuzawa et al., 1995). Neste estudo, não houve diferença significativa no peso relativo dos órgãos entre os grupos controle e tratados com PL, e

mesmo as diferenças relatadas (peso relativo do fígado e intestino) ainda se encontram dentro da variação considerada normal para camundongos Swiss (Restell et al., 2014). Algumas anormalidades foram registradas a respeito da anatomia grosseira e da histopatologia de alguns órgãos (baço, intestino, coração e pulmões). Essas anormalidades indicam leve foco inflamatório nesses órgãos, mas foram pontuais, podendo não estar relacionado ao tratamento com PL, mas a alterações ambientais ou advindas de variação genética dos camundongos heterogênicos (Casellas 2011; Chebib et al., 2020).

Visto que não houve sinais claros de toxicidade relacionados à hematologia, bioquímica, peso dos órgãos e análises histopatológicas observados nos grupos tratados, pode ser inferido que PL não produzirá toxicidade tardia. Baseado nesses resultados, o nível de efeito adverso não observado (NOAEL – No Observed Adverse Effect Level) de PL de *Calotropis procera* é maior que 1000 mg/kg/dia.

Nossos resultados mostraram que PL se mantém majoritariamente estável durante o processo de digestão, com mínima degradação mesmo após 2 horas de digestão em FGS, FIS ou mesmo após digestão sequencial, mantendo a atividade proteolítica intacta durante o processo de digestão. A análise de digestibilidade *in vitro* é importante devido à relação que existe entre a resistência de uma proteína à degradação por pepsina, tripsina e pancreatina e seu potencial tóxico (Delaney et al., 2008; Foster; Kimber; Dearman, 2013). Nesta pesquisa, mesmo PL se mostrando resistente à degradação, não houve relatos de toxicidade.

A dermatite de contato a proteínas (DCP) é uma doença de pele que aparece após o contato com materiais proteicos, como frutas, vegetais, especiarias, proteínas animais, enzimas ou borracha natural (Janssens et al., 1995). O mecanismo por trás da DCP ainda não é completamente compreendido (Janssens et al., 1995; Kanerva, 2001; Lehto et al., 2003).

Na pele, a hipersensibilidade imediata a materiais contendo proteínas se manifesta como dermatite alérgica de contato ou DCP, ou ambas (Janssens et al., 1995). Em nosso estudo, foi realizado um teste de contato com a participação de 52 voluntários na fase de indução e 43 voluntários na fase de desafio. Alguns voluntários foram retirados da pesquisa devido a faltas continuadas, desconforto ou uso de medicamentos que poderiam interferir na interpretação dos resultados. Na fase de indução, 6 voluntários

(12%) testaram positivo para alergenidade, enquanto na segunda fase, apenas 2 voluntários (5%) testaram positivo para alergenidade. Dessa forma, houve uma maior incidência de reação alérgica imediata do que tardia.

A distinção entre dermatite alérgica de contato e DCP não é muito clara. Pacientes com o diagnóstico de DCP de materiais proteicos não foram relatados anteriormente, mas o primeiro caso de dermatite de contato com esse material foi relatado após contato com o látex bruto (Shivkar; Kumar, 2003). O significado de uma reação positiva no teste de contato em relação à alergia imediata é controverso. Pode ser uma substância irritante ou pode resultar de uma sensibilização tardia a alguma substância química no material do teste. Também é possível que a alergia cause uma reação eczematosa no teste de contato, não envolvendo alergia do tipo IV tardia, a qual é mediada por células (Lehto et al., 2003).

Levando em consideração a maior incidência de resultados positivos na primeira fase (reações alérgicas imediatas) e uma menor incidência na segunda fase (reação tardia), conclui-se que as proteínas do látex de *C. procera* podem causar DCP, na razão observada de 12 a cada 100 pessoas. Já foi demonstrado que as PL são capazes de induzir a síntese de IgE em ratos (Ramos et al., 2007a), o que somado com as reações alérgicas observadas nesse estudo, dá força para a hipótese de que esse material tem uma baixa incidência de DCP.

6 CONCLUSÃO

As proteínas do látex de *C. procera* se mostraram atóxicas e seguras para uso em formulações orais ou produção de alimentos, consolidando, em parte, a base de conhecimento já presente acerca do uso seguro dessas proteínas como insumo biotecnológico. Através dos testes de contato com biomembrana contendo PL, é possível concluir que PL possui uma baixa incidência alérgica, manifestada na pele como urticária de contato, dermatite de contato ou ambas. Esses sintomas da pele juntos com os resultados anteriores que mostram a produção de IgE causada por PL, levam à conclusão de que essa reação não é toxicodermia, mas que, assim como vários materiais ricos em proteínas, PL de *C. procera* podem causar reação alérgica imediata leve.

Testes que correlacionem a aparição de alergia imediata e a detecção de IgE específicos são importantes para evoluir a investigação de alergenicidade de *C. procera*, assim como a realização de testes de toxicidade mais prolongados e com doses maiores, para determinar com precisão o NOAEL.

Contudo, os resultados aqui apresentados somam com os resultados já existentes de PL de *C. procera*, expandindo o conhecimento sobre o uso seguro dessas proteínas como insumo terapêutico.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, B.; EMIRES, S. Manufacture of fresh cheese using east African *Calotropis procera* leaves extract crude enzyme as milk coagulant. **Food Science e Nutrition**, Oxford, v. 8, p. 4831-4842, 2020.
- ABHISHEK, D. et al. Medicinal utility of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. as used by natives of village Sanwer of Indore District, Madhya Pradesh. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, Lucknow, v. 1, p. 188-190, 2010.
- AGRAWAL, A. A. et al. Cardenolides, toxicity, and the costs of sequestration in the coevolutionary interaction between monarch and milk weeds. **Biological Sciences**, Londres, v. 118, 2021.
- AHMED, O. M. et al. Cardiac and testicular toxicity effects of the latex and ethanolic leaf extract of *Calotropis procera* on male albino rats in comparison to abamectin. **SpringerPlus**, Londres, v. 5, p. 1644, 2016.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, Basel, v. 55, p. 559–564, 2006.
- ALENCAR, N.M.N. et al. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the clinically used drug for colon cancer therapy, are eliminated in experimental animals treated with latex proteins from *Calotropis procera*. (Apocynaceae). **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 31, p. 312–320, 2017.
- ALZAHIRANI, H.S.; ALMALKI, S.A.; RIZGALLAH, M.R. Study of the cytotoxic effect of *Calotropis procera* on Breast Cancer Cell Line T47D in Vitro: A Traditional Remedy. **International Journal of Scientific Innovations**, Chennai, v. 7, p. 107-112, 2019.
- ASERO, R. Lipid transfer protein cross-reactivity assessed in vivo and in vitro in the office: pros and cons. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 21, p. 129-136, 2011.
- BANKOLE, A. A.; THIEMANN, T. Chemistry, Biological Activities, and Uses of *Calotropis* Latex. **Gums, Resins and Latexes of Plant Origin**, Cham, v. 1, p. 1-32, 2022.
- BEZERRA, C. F. et al. Latex proteins from *Calotropis procera*: Toxicity and immunological tolerance revisited. **Chemico-Biological Interactions**, Burlington, v. 25, p. 138-149, 2017.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Ocalaoma, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAR, K. K. A review of contact dermatitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, Filadélfia, v.126, n. 1, p. 32-39, 2021.

BRASIL. **Instruções operacionais: informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

CASELLAS, J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. **Animal**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

CHAUDHARY, P. et al. Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, Maharashtra, v. 6, p. 69-73, 2015.

CHAUDHARY, P.; et al. Protective Effect of High Molecular Weight Protein Sub-fraction of *Calotropis procera* Latex in Monoarthritic Rats. **Pharmacognosy Magazine**, Maharashtra, v. 12, p. 147-151, 2016.

CHEBIB, J. et al. Inbred lab mice are not isogenic: genetic variation within inbred strains used to infer the mutation rate per nucleotide site. **Heredity**, Londre, v. 126, n. 1, p. 107-116, 2020.

Codex Alimentarius. **Food derived from modern biotechnology.** Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards programme, food and agriculture Organization of the United Nations. Second Edition. 2009.

CONSTABLE, A. et al. History of safe use as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 2513–2525, 2007

DELANEY, B. et al. Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, s. 2, p. S71-S97, 2008.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 73, p. 307–311, 2000.

DISPENZA, M. C. Classification of hypersensitivity reactions. **Allergy and Asthma Proceedings**, Chicago, v. 40, p. 470-473, 2019.

EL BADWI, S. M. A. et al. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, s.l. v. 105, p. 425-427, 1998.

FAHIM, H. I. et al. Nephrotoxic Effects of Abamectin and *Calotropis procera* Latex and Leaf Extract in Male Albino Rats. **American Journal of Medicine and Medical Sciences**, Lake Forest, v. 6, p. 73-86, 2016.

FAO/WHO EXPERT CONSULTATION ON ALLERGENICITY OF FOODS DERIVED FROM BIOTECHNOLOGY, 2001, Roma. **Relatório [...]**. Roma: FAO/WHO, 2001. p. 22-25.

FARIAS, D. F. et al. Food safety assessment of Cry8Ka5 mutant protein using Cry1Ac as a control Bt protein. **Food and Chemical Toxicology**, s.l. v. 81, p. 81-91, 2015.

FIGUEIREDO, I. S.T. et al. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 49; p. 512–519, 2014.

FITZPATRICK, T.B. Allergic *eczematous* contact dermatitis. **Dermatology in general medicine**, Nova Iorque, s. v, p. 512–519, 1979.

FOSTER, E. S.; KIMBER, I.; DEARMAN, R. J. Relationship between protein digestibility and allergenicity: Comparisons of pepsin and cathepsin. **Toxicology**, Oxford, v. 309, p. 30–38, 2013.

FRADE, M. A. C. et al. Natural-biomembrane dressing and hypersensitivity. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 885-91, 2011.

FREI, R.; LAUENER R.P.; CRAMERI R. Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis. **Allergy**, Londres, v. 67, p. 451–461, 2012.

FREITAS C. D.T. et al. Identification and characterization of two germin-like proteins with oxalate oxidase activity from *Calotropis procera* latex. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford. v. 105; p. 1051-1061, 2017.

FREITAS, C. D. T. et al. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, Oxford, v. 49, p. 738-743, 2011.

FREITAS, C. D. T. et al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Oxford, v. 45, p. 781-789, 2007.

FREITAS, C. D. T. **Proteínas do Látex de Calotropis procera (Ait.) R. Br. e Seus Efeitos Sobre Pragas Agrícolas**. Universidade Federal do Ceará: 2006.

FU, T.; ABBOTT, U. R.; HATZOS, C. Digestibility of Food Allergens and Nonallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluids A Comparative Study. **Agricultural and food chemistry**, Washington, v. 50, p. 7154–7160, 2002.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, Londres, v. 454, p. 445–454, 2008.

GILHOTRA, R.; GHULE, P.; BAIRAGI, S. M. Pharmacology of Natural Products: An recent approach on *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera* Farmacología de productos naturales: un enfoque reciente en *Calotropis gigantea* y *Calotropis procera* Shripad. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 59, p. 1-8, 2018.

GÓMEZ-CASADO, C.; DÍAZ-PERALES, A. Allergen-Associated Immunomodulators: Modifying Allergy Outcome. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, Varsovia, v. 64, p. 339–347, 2016.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro – A review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, p. 983–996. 2011.

- HEINRICH, M. et al. Best Practice in the chemical characterisation of extracts used in pharmacological and toxicological research- The CanPhyMP- Guidelines. **Frontiers in Pharmacology**, s. 1., v. 13, p. 1-12, 2022.
- HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**. Londres, v. 8, p. 218–230, 2008.
- JANSSENS, V. et al. Protein contact dermatitis: myth or reality? **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 132, n. 1, p. 1–6, 1995.
- KANERVA, L. Skin contact reactions to spices: a review. **Acta Dermatoven APA**, Slovenia, v. 10, n. 1, 2001.
- KOSARAJU, S. K. M. et al. Risk Factors for Suicidal Attempts Among Lower Socioeconomic Rural Population of Telangana Region. **Indian Journal of Psychological Medicine**, Nova Delhi, v. 1, p. 3730-3735, 2015.
- KRITIKAR, K. R.; BASU, B. D. *In: Indian Medicinal Plants*, International Book Distributors, Dehradun, v. 3, p. 1610, 1999.
- KUMAR, V. L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 123-125, 1994.
- KUMAR, V.L. et al. Protection afforded by methanol extract of *Calotropis procera* latex in experimental model of colitis is mediated through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Oxford, v. 109, p. 1602–1609, 2019.
- KUMAR, V.L.; VERMA, S.; DAS, P. Anti-inflammatory and antioxidant effect of methanol extract of latex of *Calotropis procera* in rat model of colorectal cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 296, p. 1-10, 2022.
- KWON, C. W. et al. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. Revealed by De Novo Transcriptome Analysis. **Plos one**, s. 1., p. 1-15, 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, Londres, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEHTO, M. et al. Epicutaneous Natural Rubber Latex Sensitization Induces T Helper 2-Type Dermatitis and Strong Prohevein-Specific IgE Response. **Journal of Investigative Dermatology**, Nova Iorque, v. 120, n. 4, p. 633–640, 2003.
- LIMA, J. M. et al. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. **Toxicon**, Oxford, v. 57, p. 183–185, 2011.
- LIMA, R. C. S. et al. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & Behavior**, Oxford, v. 23, p. 123–126, 2012.
- LIMA, R. et al. Central Nervous System Activity of Acute Administration of Latex Proteins from *Calotropis procera* in Mice. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, Berlin, v. 7, p. 1-12, 2010.

LIMA-FILHO, J. V. et al. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella* entérica serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 129, p. 327–334, 2010.

MAHMOUD, O. M.; ADAM, S. E. I.; TARTOUR, G. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants. II. Effects of administration of the latex to sheep and goats. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v. 89, p. 251–263, 1979.

MATSUZAWA, T. et al. Selection of appropriate parameters, use of a quality control concept, and suitable statistical analyses for clinical pathology examination of animals in toxicity studies: Results of a current survey by the Japanese pharmaceutical manufacturers association. **Comparative Haematology International**, Paris, v. 5, n. 3, p. 196–200, 1995.

MORENO, F. B. M. B. et al. Crystal Structure of an antifungal laticifer protein. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, Nova Iorque, v. 54, p. 170–173, 2004.

MOTTA, AA; AUN, MV; GIAVINA-BIANCHI, P. Dermatite de contato. **Ver Bras Alerg Imunopatol**, São Paulo, v. 34, p. 73–82, 2011.

NASCIMENTO, D. C. O. et al. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, Oxford, v. 23, p. 745–753, 2016.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents**. Paris: OECD, 2008.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents**. Paris: OECD, 2018.

OLIVEIRA, J. P. B. et al. Use of *Calotropis procera* cysteine peptidases (CpCPs) immobilized on glyoxyl-agarose for cheesemaking. **Food Chemistry**, Oxford, v. 403, p. 1–13, 2023.

OLIVEIRA, J. S. et al. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, p. 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, J. S. et al. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Berlin**, v. 382, p. 139–149, 2010.

OLIVEIRA, J.P.B. et al. Allergenicity reduction of cow's milk proteins using latex peptidases, **Food Chemistry**, Oxford, v. 284, p. 245–253, 2019.

OLIVEIRA, K. A. et al. Phytomodulatory proteins isolated from *Calotropis procera* latex promote glycemic control by improving hepatic mitochondrial function in HepG2 cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Basel, v. 29, p. 1061–1069, 2021.

OLIVEIRA, K.A. et al. Phytomodulatory proteins promote inhibition of hepatic glucose production and favor glycemic control via the AMPK pathway **Biomedicine & Pharmacotherapy**, s.l., v. 109, p. 2342–2347, 2019.

OLIVEIRA, R. S. B. et al. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation research**, Nova Iorque, v. 61, p. 689–698, 2012.

OZARDE, Y. S.; CHOUDHARI, V. P. Preliminary Qualitative Phytochemical Analysis and Acute Oral Toxicity Study of Latex of an Ethnomedicinal Plant *Euphorbia fusiformis* Buch.-Ham.Ex D.Don. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, s.l., v. 1, p. 1123–1127, 2022.

PINTO, C. C.; NOVELL, V. S.; GIMÉNEZ-ARNAU, A. M. Practical Advice to Correctly Perform Patch Test. **Curr Treat Options Allergy**, Nova Iorque, v. 6, n. 1, p. 71–91, 2019.

RADHABOY, G. et al. Analysis of Thermo chemical behaviour of *Calotropis procera* parts for their Potentiality. **International Journal of Ambient Energy**, Londres, v. 43, p. 252–258, 2019.

RAMOS, M. V. et al. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 111, n. 1, p. 115–122, 2007a.

RAMOS, M. V. et al. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, Oxford, v.173, p. 349–357, 2007b.

RAMOS, M. V. et al. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod-Plant Interactions**, Berlim, v. 4, p. 57–67, 2010.

RAMOS, M. V. et al. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlim, v. 385, p. 455–463, 2012.

RAMOS, M. V. et al. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, Berlim, v. 389, p.747–756, 2016.

RAMOS, M. V. et al. Anti-inflammatory latex proteins of the medicinal plant *Calotropis procera*: a promising alternative for oral mucositis treatment. **Inflammation Research**, Basel, v. 69; p. 951–966, 2020.

RASIK, A.M. et al. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology**. Amsterdã, v. 68, p. 261–266, 1999.

RESTELL, T. I. et al. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. **Acta Cirurgica Brasileira**. São Paulo, v. 29, n. 5, p. 306–312, 2014.

RUTTEN, A. M.; STATIUS VAN EPS, L.W. Poisoning with toxic plants in Curacao in 1766. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**. Amsterdã, v. 142, p. 2796-2798, 1998.

SAGGAR, S. et al. Traditional and herbal medicines opportunities and challenges. **Pharmacogn Res.** s. l., v. 14; p. 107-114, 2022.

SAHA, S; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic acids research**. Oxford, v. 34, p. 202-209, 2006.

SARKODIE, J. A. et al. Potential hepatic dysfunction associated with the use of the leaf and latex extracts of *Calotropis procera* W. T. Aiton (Asclepiadaceae) in Sprague-Dawley rats: an acute toxicity study. **Current Topics in Toxicology**. s. l., v. 18, p. 45–56, 2022.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators of Inflammation**. Oxford, v. 12, n. 5, p. 299–302, 2003.

SILVA, M. Z. R. et al. Biotechnological potential of a cysteine protease (CpCP3) from *Calotropis procera* latex for cheesemaking. **Food Chemistry**. Oxford, v. 307, p. 125574, 2020.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. Cambridge, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SINGHAL, A.; KUMAR, V. L. Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat. **Journal of Ethnopharmacology**. Amsterdã, v. 122, p. 172–174, 2009.

SINHA, M. et al. Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. **The Scientific World Journal Volume**. s. l., v. 543195, p. 19, 2014.

SOUSA, B. F. et al. Latex proteins downregulate inflammation and restores blood-coagulation homeostasis in acute *Salmonella* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 115, p. 1-12, 2020.

SPIEWAK, R. Patch Testing for Contact Allergy and Allergic Contact Dermatitis. **The Open Allergy Journal**, s. l., v. 1, p. 42-51, 2008.

STEVENS, K. R. Issues in chronic toxicology. **Principles and methods of toxicology**, Boca Raton, v. 673, p. 10-25, 1994.

TAVAKKOLI, H. et al. Evaluation of the toxicopathological lesions of *Calotropis procera* using a chick embryonic model. **Comparative Clinical Pathology**, s. l., v. 28, p. 195–202, 2019.

TAVARES, L. S. et al. Recombinant osmotin inclusion bodies from *Calotropis procera* produced in *E. coli* BL21(DE3) prevent acute inflammation in a mouse model of listeriosis. **Phytomedicine**, Oxford, v. 102, p. 1-8, 2022.

TRAESEL, G. K. et al. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 74, p. 320-325, 2014.

TRIPATHI, M. et al. Pharmacognostic study of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton root and stem. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, s. l., v. 43, p. 93-103, 2022.

VERMEIRSEN, V. et al. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. **Biochimie**, Paris, v. 86, p. 231-239, 2004.

VERMELHO A. B. et al. Application of Microbial Enzymes in the Food Industry, **Advances in Food Biotechnology**, s. l., p. 103–132, 2015.

VIANA, C.A. et al. Cytotoxicity against tumor cell lines and anti-inflammatory properties of chitinases from *Calotropis procera* latex October. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 390, p. 1005–1013, 2017.

WALBERG, J.E., MAGNUS, L. Patch testing. In: Frosch PJ, Menne T, Lepoittevin J-P, editors. **Contact dermatitis**. Berlin, v. 1, p. 365-90, 2006.

YANG, X. et al. Purification and identification of peptides with high angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity from honeybee pupae (*Apis mellifera*) hydrolysates with *in silico* gastrointestinal digestion. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 245, p. 535–544, 2019.

YEANG, H. Y. et al. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, Oxford, v. 27, p. 32-45, 2002.

ZHOU, H. et al. Negative interactions balance growth and defense in plants confronted with herbivores or pathogens. **Agricultural and food chemistry**, Washington, v. 70; p. 12723-12732, 2022.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), desta pesquisa. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar. Após ter sido esclarecido (a) sobre o estudo e não tiver dúvidas, se aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias (uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável). Em caso de recusa, não haverá penalidade alguma e você continuará sendo atendido como sempre nesta instituição.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

TÍTULO: “ESTUDO CLÍNICO DO POTENCIAL DE IRRITABILIDADE E SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA DA BIOMEMBRANA COMPOSTA DE PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (BioMem CpLP)”

- O objetivo do estudo é comprovar a ausência do potencial de Irritabilidade e Sensibilização cutânea de uma biomembrana contendo proteínas laticíferas de *Calotropis procera* para uso fitoterápico.
- O estudo será guiado pelos professores pesquisadores da Universidade Federal do Ceará, Nylane Maria Nunes de Alencar, Márcio Viana Ramos e seus estudantes, bem como a dermatologista Dra. Maria Araci Pontes Aires;
- Será realizado na Universidade Federal do Ceará nos Campus do PICI – Av Humberto Monte, s/n Bloco 907 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, Ceará e no Campus do Porangabuçu localizado na rua Coronel Nunes de Melo 1000 Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, rua Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará;
- A pesquisa será realizada em até 60 participantes;
- Sua participação no estudo será de 5 semanas para a pesquisa de Irritabilidade/Sensibilização, totalizando até 12 encontros durante o período;
- Irritabilidade e Sensibilização cutânea são reações de irritação e alergia que podem ocorrer na sua pele, após aplicação do material;
- Em todos os retornos, o tempo de permanência será de aproximadamente 1 hora ou até finalização dos procedimentos da pesquisa;
- Todos os dias que você deverá comparecer para a pesquisa (retornos) estão descritos no cronograma que você receberá no início do estudo;
- Para a pesquisa de Irritabilidade Acumulada e Sensibilização será aplicado o “teste de contato” (fita adesiva) contendo o produto avaliado no dorso (costas) direito, durante três semanas consecutivas. Você deverá comparecer às segundas, quartas e sextas-feiras para aplicação e leitura. Após esse período, chamado de “indução”, você ficará em descanso por, no mínimo, 10 dias e deverá retornar para aplicar novamente o “teste de contato” agora no lado esquerdo do dorso e será removido pelo responsável após aproximadamente 48 horas e você deverá comparecer para realização das leituras;
- Não molhe o “teste de contato” durante todo o período do estudo e não o exponha ao sol por períodos prolongados.
- Fica também proibido durante o estudo todo e qualquer tratamento dermatológico. Caso o tratamento seja necessário, comunique imediatamente ao responsável da pesquisa.
- Comunicar ao responsável o uso de qualquer tipo de medicamento tópico (uso externo/pele) ou sistêmico (comprimidos e líquidos (soluções e xaropes) de uso oral ou injeções), como cortisona, antialérgico ou qualquer outro;

- Você poderá ser dispensado (a) após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido caso apresente algum dos critérios de exclusão da pesquisa;
- Você se compromete a não participar de nenhuma outra pesquisa no decorrer deste estudo;
- Caso seja do sexo feminino, você afirma não estar grávida ou amamentando e se compromete a não engravidar durante o período do estudo;
- Você aceita que, no contexto deste estudo, seus dados serão coletados e podem estar sujeitos a processamento eletrônico. Caso ocorra alguma alteração nos seus dados cadastrais (telefone, endereço, etc....), solicitar aos organizadores do estudo que estas sejam atualizadas;
- Como qualquer produto, poderá causar reações inesperadas como “vermelhidão”, “inchaço”, “coceira” e “ardor” nos locais de aplicação dos produtos. No caso de coceira moderada, persistente ou intensa e ainda outros sinais de irritação, comunique imediatamente, pelo telefone (85) 3366 8339;
- Como benefício desta pesquisa, a sua participação contribuirá para o lançamento/comercialização de uma biomembrana contendo proteínas laticíferas de *Calotropis procera*, um potencial produto fitoterápico;
- Todas as dúvidas surgidas durante e após a pesquisa serão esclarecidas;
- Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária;
- Você poderá se retirar da pesquisa a qualquer instante se assim desejar, no entanto, deve comunicar a sua retirada;
- Você poderá ser retirado (a) do estudo caso não cumpra com suas responsabilidades, segundo o protocolo do estudo, caso falte mais de 2 vezes consecutivas aos encontros, não sendo essas o primeiro encontro nem após o repouso de 10 dias;
- Sua colaboração voluntária será de grande importância para a pesquisa, portanto pedimos que compareça nos horários e datas indicados durante todo o decorrer da pesquisa;
- Se houver qualquer modificação nos seus hábitos, solicitamos que nos comunique para melhor interpretação dos resultados;
- Não usar qualquer tipo de produto (ex.: desodorante ou antiperspirante, talco, óleo para banho, cremes, loções, perfumes, colônias e medicações tópicas) nas áreas próximas à do teste. Caso utilize algum destes produtos ou faça uso de qualquer medicação, avise;
- Caso você apresente uma reação adversa com sinal clínico (reação que seja possível de ser observada com os olhos: vermelhidão, inchaço, etc), fotos serão realizadas com o objetivo único de investigação da reação e registros destas informações;
- Sua identidade será mantida em todo o processo e somente os pesquisadores do estudo poderão ter acesso a estes registros;
- Garantimos que qualquer nova informação relevante (informação de importância) que possa interferir em seu consentimento será comunicada;
- Todas as informações obtidas sobre os participantes serão mantidas em sigilo (segredo), sendo que, ao assinar esse termo, você dá liberdade aos pesquisadores responsáveis de realizarem análises dos documentos e dados da pesquisa;
- Uma via deste termo permanecerá com os responsáveis da pesquisa e a outra será entregue a você;
- Estou ciente que as fotos obtidas para o procedimento de investigação caso ocorra uma reação fazem parte do procedimento desta pesquisa e concordo com a obtenção destas imagens.

O abaixo assinado _____

, ____anos, RG:_____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa intitulada “ESTUDO CLÍNICO DO POTENCIAL DE IRRITABILIDADE E SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA DA BIOMEMBRANA COMPOSTA DE PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (BioMem CpLP)”. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Assinatura do participante:_____Data:_____
Assinatura do pesquisador:_____Data:_____

Fortaleza,_____de _____de_____.

APÊNDICE B – CRONOGRAMA DA PESQUISA

1) Assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE

2) Encontros

3 encontros semanais durante 3 semanas consecutivas com intervalos de 2 dias e 3 dias (nos finais de semana)

Segundas, quartas e sextas-feiras, repouso de 10 dias, seguido de mais dois encontros (após 48 e 72h)

ENCONTROS	DATA	PROCEDIMENTO	OBSERVAÇÕES
1º		Aplicação	Não pode faltar
2º		Remoção/Leitura/Aplicação	
3º		Remoção/Leitura/Aplicação	
4º		Remoção/Leitura/Aplicação	
5º		Remoção/Leitura/Aplicação	
6º		Remoção/Leitura/Aplicação	
7º		Remoção/Leitura/Aplicação	
8º		Remoção/Leitura/Aplicação	
9º		Remoção	
10º - Retorno		Aplicação	Não pode faltar
11º		Remoção/Leitura	
12º		Leitura	

* Não faltar em mais de duas faltas alternadas desde que não seja no primeiro dia da pesquisa e no retorno após o período de descanso

APÊNDICE C - ENTREVISTA APLICADA AOS VOLUNTÁRIOS

Data da coleta de dados: ____/____/____ Número do Participante: _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ RG: _____
Nome da mãe: _____
Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: () masculino () feminino
Endereço: _____
Telefones para contato: _____
Profissão: _____
Escolaridade: _____
Estado civil: _____

1 Apresenta alguma doença?

- () Anemia;
- () Diabetes: glicemia usual _____ mg/dl. Está controlado? () Sim () Não
- () Hipertensão: valores usuais _____ mmHg. Está controlada? () Sim () Não
- () Portador de alguma doença de pele? Qual? _____
- () Câncer;
- () Doenças de origem infecciosa. Qual? _____
- () Doença de origem cardíaca ou vascular. Qual? _____
- () Doença de origem renal. Qual? _____
- () Portador de imunodeficiências;
- () Asma;
- () Rinite;
- () Outras _____

2. Antecedentes pessoais de hipersensibilidade

- () Dermatite de contato (metais, perfumes, produtos com látex); _____
- () Medicamentos. Quais? _____
- () Urticária;
- () Conjuntivite;
- () Alimentos. Quais? _____
- () Corantes;
- () Insetos ;
- () Adesivos (esparadrapos);

3. Tipo de pele (Fototipo de acordo com a exposição solar)

- () I Queima-se sempre, nunca se bronzeia.
- () II Queima-se sempre, bronzeia-se minimamente
- () III Queima moderadamente, bronzeia-se gradualmente
- () IV Queima-se minimamente, bronzeia-se bem
- () V Raramente se queima, bronzeia-se intensamente
- () VI Nunca se queima, pele profundamente pigmentada.

4. Uso de medicamentos

Está utilizando algum medicamento de uso crônico? Se sim, quais.

PESQUISADOR

RESPONSÁVEL: _____

Fortaleza, _____ de _____ de _____.

APÊNDICE D – AVALIAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Nº do Participante: _____

Nome do Participante: _____

1. Primeira aplicação: Data _____

2. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

Notação	Descrição	Interpretação
- ou Ø	Sem alterações cutâneas	Teste negativo.
?+	Eritema leve	Não há evidência de sensibilização- teste negativo.
+	Eritema palpável. Edema/infiltrado moderado. Pápulas poucas ou ausentes. Vesículas ausentes.	Reação de sensibilização fraca- teste positivo.
++	Infiltrado forte. Pápulas em grande quantidade. Vesículas presentes.	Reação de sensibilização forte- teste positivo.
+++	Vesículas coalescentes. Bolhas. Ulceração.	Reação de sensibilização extrema- teste positivo.
IR	Inflamação limitada à área exposta. Nenhuma infiltração. Pequenas petéquias. Pústulas. Eflorescências diferentes de pápulas ou vesículas.	Reação de irritação - teste de sensibilização negativo.

3. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

4. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

5. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

6. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

7. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

8. Leitura + aplicação Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

9. Somente leitura Data _____

Resultado: _____ Reação adversa: _____

10. Após repouso de no mínimo 10 dias, aplicação do “Patch Test” Data: _____

Resultado

1ª Leitura (48h)	2ª Leitura (72h)

(-) = reação ausente; (?) = eritema leve; (+) = eritema nítido; (++) = eritema + edema + pápulas; (+++) = eritema + edema + pápulas + vesículas

APÊNDICE E – DADOS BRUTOS DO TESTE DE CONTATO

FASE 1

FASE 2

Nº do Participante	Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura + Aplicação	Leitura	Aplicação	Leitura	Leitura
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	1	1	2	2	2	0	0	3	0
3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0
6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0
8	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	2/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
12	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
13	0	0	0	2/R	R	R	R	R	R	R	R	R
14	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
16	0	0	1	X	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
20	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
21	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0
22	0	0	1	1	X	1	1	1	1	0	1	0
23	F	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
24	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
27	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0

28	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	X	1	0	0	0	0
31	0	0	1	1	R	R	R	R	R	R	R	R
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
34	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	1	X	1	0	0	0	0	0	2	1
37	0	0	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
38	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
39	0	1	X	1	X	1	0	0	0	0	0	0
40	0	2	2	2	2	2	X	2	2	1	1	0
41	0	0	1	1	1	1	2	1	X	1	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	F	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
46	0	0	1	1	1	R	R	R	R	R	R	R
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda:

X: Não aplicado / Não realizada leitura

F: Falta

R: Retirado da Pesquisa

0: Reação ausente (teste negativo)

1: Eritema Leve (não há evidência de sensibilização - teste negativo)

2: Eritema Nítido (reação de sensibilização fraca – teste positivo)

3: Eritema + Edema + Pápulas (reação de sensibilização forte – teste positivo)

APÊNDICE F – CARACTERÍSTICAS DOS VOLUNTÁRIOS

Nº do Voluntário	Sexo	Idade	Tipo de Pele	Doença preexistente	Histórico de hipersensibilidade	Uso de Medicamento
1	Homem	19	IV			Não
2	Mulher	28	III	Rinite	Dermatite De Contato E Conjuntivite	Sim
3	Mulher	27	II		Insetos	Sim
4	Mulher	46	II			Não
5	Mulher	20	III			Não
6	Mulher	21	II	Rinite	Medicamento	Não
7	Homem	18	II	Rinite		Não
8	Homem	29	III			Não
9	Homem	29	IV	Sinusite	Medicamento	Não
10	Homem	29	I			Não
11	Mulher	22	II			Sim
12	Mulher	26	IV		Insetos	Não
13	Mulher	26	IV		Conjuntivite	Não

14	Homem	32	IV			Não
15	Mulher	27	IV	Rinite		Não
16	Homem	29	III			Não
17	Homem	20	III		Dermatite De Contato E Conjuntivite	Sim
18	Mulher	24	IV	Rinite	Conjuntivite e Insetos	Não
19	Mulher	24	III			Não
20	Homem	19	I	Rinite	Conjuntivite	Não
21	Mulher	30	IV	Rinite	Dermatite de contato e Insetos	Não
22	Homem	34	III			Não
23	Mulher	26	III	Rinite		Sim
24	Homem	25	IV		Urticária, Conjuntivite, Alimentos e Insetos	Não
25	Mulher	25	I	Doença Renal e Rinite	Dermatite de contato, Conjuntivite, Alimentos, Corante e Insetos	Sim
26	Mulher	19	II			Não
27	Mulher	20	5	Rinite	Insetos	Não
28	Homem	19	II		Medicamento e Conjuntivite	Não
29	Homem	27	IV			Não
30	Homem	21	II	Rinite	Conjuntivite	Não
31	Mulher	24	III	Rinite	Alimentos	Não

32	Mulher	33	II	Rinite	Dermatite de Contato, Medicamento e Insetos	Sim
33	Homem	20	II			Não
34	Homem	20	IV	Doença Cardíaca e Rinite	Dermatite de Contato, Medicamento e Insetos	Não
35	Mulher	26	II			Não
36	Homem	37	IV		Urticária, Conjuntivite e Insetos	Não
37	Homem	31	III	Rinite	Conjuntivite	Não
38	Mulher	25	II	Rinite	Dermatite de Contato e Insetos	Não
39	Mulher	19	IV			Não
40	Homem	28	III			Não
41	Homem	24	III		Medicamento	Não
42	Homem	19	III			Não
43	Homem	44	III	Doença Cardíaca	Urticária	Sim
44	Mulher	45	IV		Dermatite de Contato	Sim
45	Homem	21	IV	Rinite	Medicamento	Não
46	Homem	23	IV			Não
47	Mulher	51	IV	Hipertensão	Medicamento	Sim
48	Mulher	46	III	Rinite	Medicamento	Sim

49	Mulher	29	III	Rinite	Medicamento	Não
50	Homem	20	II		Medicamento	Não
51	Homem	19	II	Rinite		Não
52	Mulher	29	III			Sim