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

MAYARA PATRÍCIA VIANA DE MATOS

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)

FORTALEZA
2013

MAYARA PATRÍCIA VIANA DE MATOS

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)

Trabalho de dissertação submetido à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

M382a Matos, Mayara Patrícia Viana de.
Aspectos bioquímicos e etnofarmacológicos do látex de *himatanthus drasticus* mart. (plumel) . / Mayara Patrícia Viana de Matos. – 2013.
106 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
.

1. Antiinflamação. 2. Antinocicepção. 3. Toxicologia. 4. Proteínas laticíferas. I. Título.

CDD 574.192

MAYARA PATRÍCIA VIANA DE MATOS

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)

Trabalho de dissertação submetido à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Dissertação aprovada em: 22/02/13

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes Alencar
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dra. Selene Maia de Morais
Universidade Estadual do Ceará- UECE

Dedico a aqueles que me ensinaram a lutar...

Aos meus pais: Margarida e Matos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser minha constante inspiração, proteção e consolo em todos os momentos de minha vida.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de estudos.

Ao meu orientador **Márcio Ramos**: por todos estes seis anos de orientação, desde a iniciação científica até o mestrado; por ter sido um exemplo de profissionalismo e dedicação como pesquisador e orientador; pela confiança concedida a mim, permitindo que eu construísse meu pensamento científico de maneira independente, mas ao mesmo tempo orientada; por permitir que eu passasse a experiência adquirida nestes anos para outros estudantes; por proporcionar-me o contato com as diversas linhas de pesquisa do laboratório e com pesquisadores de outras instituições, ampliando minha visão como futura pesquisadora; por esclarecer minhas dúvidas e indicar formas de chegar a soluções plausíveis; por acreditar no meu potencial e deixar-me isso claro, incentivando minha vontade de ser uma profissional melhor. Agradeço imensamente!

À professora **Nylane Alencar** por ter coorientado este trabalho; por sua constante gentileza e disponibilidade em esclarecer meus questionamentos e discutir a realização de novos ensaios; por disponibilizar a estrutura, os reagentes, além de estudantes de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À professora **Selene de Morais**, por ter prontamente concordado em avaliar este trabalho e pelas valiosas sugestões que foram dadas para o aperfeiçoamento deste.

À **Ingrid Figueiredo,** por me auxiliar nos experimentos para elucidação do mecanismo de ação; pelos os ensinamentos das técnicas e interpretação dos resultados; pela constante gentileza e atenção em encaixar meus experimentos nas demais atividades da sua rotina e responder quaisquer dúvidas que eu tivesse.

À professora **Renata Leitão**, por ter realizado as análises histopatológicas de amostras deste trabalho.

À **Raquel Sombra** e **Jefferson Oliveira**, agradeço por terem sido os responsáveis por me iniciar na experimentação animal quando entrei no laboratório; passando as metodologias, as melhores formas de manuseio e ética neste tipo de ensaios. Mesmo que não mais estejam na equipe do laboratório, vocês foram essenciais no desenvolvimento das habilidades que adquiri neste campo. Muito Obrigada!

Aos meus colegas de laboratório por todas as experiências vividas, pelas muitas gargalhadas trocadas, pelos diversos momentos de descontração, por estarem sempre dispostos a auxiliar-me de todas as formas: **Ayrles Brandão, Bárbara Amaral, Beatriz Nishi, Carolina Viana, Cleverson Diniz, Danielle Aragão, Diego Souza, Eliane Araújo, Juliany Fátima, Lídia Silva (in memorium), Natália Fernandes, Renato Marques, Wallace Cruz.** Também adiciono aqui **Fabiano Teixeira**, **Felipe Sousa, José Camilo** e **Tiago Jucá**, os quais, mesmo sendo de outros laboratórios no momento, merecem os mesmos agradecimentos. Agradeço a cada um de vocês!!

De forma especial, agradeço à: **Ayrles, Carol, Dani, Eliane e Fabiano**. No decorrer destes anos pudemos construir uma relação de sincera amizade! Dividiram comigo mais que os problemas do laboratório, mais que os sorrisos rotineiros. Vocês receberam minhas alegrias e preocupações e souberam me ajudar sempre que possível. Tenho certeza que tenho a lealdade de vocês, assim como vocês tem a minha. A vocês minha sincera amizade!

Aos meus sempre amados pais: **Maria Margarida** e **Francisco Matos,** agradeço por serem meus alicerces!! Por estarem ao meu lado em todo e qualquer momento, apoiando minhas decisões, dando todo o suporte possível para que meus objetivos sempre se tornem realidade. Por serem as principais razões pelas as quais eu luto para ser uma profissional qualificada e uma pessoa de bem. E principalmente por me darem o amor puro e desinteressado dos verdadeiros pais. Porque quando um vence, todos nós vencemos! A vocês dedico toda minha admiração e tudo que posso desejar de mais sincero em mim! Amo muito vocês!!

Às minhas queridas irmãs **Mayanne** e **Neide**, por todo o apoio e incentivos aos meus estudos; pelos muitos sorrisos e momentos de apoio; por serem minhas companheiras de sempre!! Pra onde quer que o destino nos leve, nossos laços estarão sempre firmes! Amo vocês!

Às minhas muito queridas: **vovó Maria** e **tias Socorro** e **Lucilene**, agradeço por serem minhas segundas mães; por terem tido uma participação fundamental em todos os sucessos que obtive até hoje; por auxiliarem na construção do meu desenvolvimento como pessoa, assim como por todos os demais auxílios! Vocês merecem toda minha dedicação!

Aos meus grandes amigos, que desde a época de graduação aguentam minhas loucuras: **Amanda Honório (Mandis), Delano Borges, Duillys Nascimento (Duds), Frederico Garcia (Fred), João Victor Serra Nunes, Júnior Melo (Areia), Lívia Xavier e Stelamaris Paula (Stela)**, agradeço por tudo que vocês representam na minha vida! A vida nos levou para as sempre ocupadas rotinas, alguns foram até para outros lugares, mas a amizade nos deixa sempre juntos! A vocês, minha sincera amizade diante de todos os momentos que vivemos e ainda viveremos!

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica**, por terem contribuído, cada um a sua forma, na formação de meu pensamento científico.

Ao **Neto**, por desempenhar muito bem o seu trabalho de cuidar dos animais de experimentação, proporcionando a estes as condições necessárias para a realização dos experimentos segundo as normas éticas.

A todos os demais que, em algum momento, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu mais sincero: Obrigada!

"A nossa maior glória não reside
no fato de nunca cairmos, mas sim em
levantarmo-nos sempre depois de cada queda."
Confúcio

SUMÁRIO

Tópico	Título	Página
	LISTA DE FIGURAS.....	**XIV**
	LISTA DE TABELAS.....	**XVI**
	ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	**XVII**
	RESUMO.....	**XVIII**
	ABSTRACT.....	**XIX**
1	**INTRODUÇÃO**.....	**1**
1.1	Látex: aspectos gerais.....	**1**
1.2	Composição química do látex.....	**3**
1.3	Papel fisiológico do látex.....	**3**
1.4	Etnofarmacologia: o uso das plantas medicinais a partir do conhecimento popular.....	**4**
1.5	*Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel) e seu uso na medicina popular.....	**5**
1.6	Potencial farmacológico de outras espécies de plantas laticíferas.....	**8**
1.7	A resposta inflamatória.....	**9**
1.7.1	Eventos vasculares.....	**10**
1.7.2	Eventos celulares.....	**11**
1.7.3	Mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória.....	**13**
1.7.3.1	Óxido nítrico.....	**13**
1.7.3.2	Citocinas.....	**14**

1.8 Dor e nocicepção..... **16**

2 **JUSTIFICATIVA**..... **17**

3 **HIPÓTESE**..... **18**

4 **OBJETIVOS**..... **18**

5 **MATERIAIS E MÉTODOS**..... **20**

5.1 Reagentes e fármacos..... **20**

5.2 Material Vegetal..... **20**

5.3 Coleta do látex..... **20**

5.4 Fracionamento do fluido laticífero..... **21**

5.5 Caracterização bioquímica..... **22**

5.5.1 Cromatografia de troca iônica..... **23**

5.5.2 Cromatografia em camada delgada..... **23**

5.5.3 Perfil qualitativo de fitoquímicos..... **23**

5.5.3.1 Teste para fenóis e taninos..... **24**

5.5.3.2 Teste para flavonóides..... **24**

5.5.3.3 Teste para esteróides e triterpenóides..... **24**

5.5.3.4 Teste para saponinas..... **25**

5.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)..... **25**

5.6 Ensaios biológicos..... **26**

5.6.1 Animais..... **26**

5.6.2 Avaliação da atividade antiinflamatória no látex íntegro (LJ), fração HdLP e picos cromatográficos de *H. drasticus*..... **26**

5.6.3 Dosagem dos níveis de óxido nítrico no plasma de animais tratados com LJ e HdLP via oral..... **27**

5.6.4 Efeito de bloqueadores da síntese de óxido nítrico sobre a migração de neutrófilos em animais tratados com HdLP via oral..... **28**

5.6.5 Dosagem de citocinas no plasma e fluido peritoneal de animais tratados com HdLP via oral..... **28**

5.6.6 Histologia e análise morfológica de baço, fígado e rins de animais tratados com HdLP via oral..... **29**

5.6.7 Avaliação de efeitos de toxicidade aguda após ingestão de látex íntegro (LJ) e fração protéica (HdLP) de *Himatanthus drasticus*..... **30**

5.6.8 Avaliação da persistência da atividade antiinflamatória na fração HdLP após desnaturação térmica e tratamento enzimático..... **30**

5.6.9 Investigação de atividade pró-inflamatória na fração HdLP..... **31**

5.6.10 Avaliação de efeito antinociceptivo em animais tratados com HdLP **31**

5.6.10.1 Modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético..... **32**

5.6.10.2 Teste da formalina…….. **32**

5.6.11 Investigação de déficits neurológicos e anormalidades na coordenação motora de animais tratados com a fração HdLP..... **32**

5.6.11.1 Teste Rota-rod..... **33**

5.6.11.2 Teste do campo aberto..... **33**

5.6.12 Análise estatística..... **33**

6 **RESULTADOS**..... **35**

6.1 Caracterização bioquímica..... **35**

6.2 Ensaios Biológicos..... **37**

7 **DISCUSSÃO**..... ..... **55**

8 **CONCLUSÃO**..... **63**

9 **PERSPECTIVAS**..... **64**

REFERÊNCIAS..... **65**

ANEXOS..... **86**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Perfil anatômico dos quatro tipos de laticíferos mostrado por meio de corte longitudinal do caule (ou do carpelo, nos casos de *Lactuca sativa* e *Papaver somniferum*).....	**2**
FIGURA 2	Representações de *Himatanthus drasticus*.....	**6**
FIGURA 3	Representação da resposta inflamatória do organismo diante de um dano tecidual e/ou infecção bacteriana.....	**12**
FIGURA 4	Esquema do fracionamento do látex de *H. drasticus*, do qual resultaram três frações distintas.....	**22**
FIGURA 5	Avaliação da presença do triterpeno lupeol (R_f 0,75) na fração protéica de *H. drasticus*.....	**35**
FIGURA 6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS e β-Mercaptoetanol (painel esquerdo) e seu correspondente revelado com reagente de Schiff (painel direito).....	**37**
FIGURA 7	Efeito antiinflamatório de LJ na migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos.....	**38**
FIGURA 8	Atividade antiinflamatória via oral (a) e via endovenosa (b) de HdLP na migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos.....	**39**
FIGURA 9	Aumento nos níveis de óxido promovidos por HdLP (a) e LJ (b) no plasma sanguíneo de animais tratados via oral.....	**40**
FIGURA 10	Efeito dos inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida (L-NAME e AG) sobre a atividade antiinflamatória das proteínas do látex de *H. drasticus*.....	**41**
FIGURA 11	Fração HdLP altera os níveis de IL-1 (a) e TNF-α (b) no fluido peritoneal de ratos no modelo de peritonite induzido por carragenina.....	**42**
FIGURA 12	Tratamento com HdLP previne efeitos tóxicos decorrentes da administração de carragenina.....	**43**
FIGURA 13	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β-Mercaptoetanol.....	**45**
FIGURA 14	Atividade antiinflamatória do pico cromatográfico II – DEAE-	**45**

Sepharose *fast flow* oriundo de HdLP, por via endovenosa.....

FIGURA 15 Efeito pró-inflamatório da fração HdLP sobre a migração de neutrófilos em ratos..... **46**

FIGURA 16 Efeito da fração HdLP sobre a coordenação neurológica (a) e locomotora (b) de camundongos..... **49**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Perfil qualitativo de fitoquímicos na fração HdLP de *Himatanthus drasticus*.....	**36**
TABELA 2	Efeito da desnaturação por aquecimento e clivagem enzimática sobre a atividade antiinflamatória de HdLP (1,0 mg/kg).....	**44**
TABELA 3	Atividade antinociceptiva de HdLP na resposta à contorção induzida por ácido acético.....	**47**
TABELA 4	Efeito inibitório de HdLP sobre a lambedura de pata induzida pela injeção subplantar de formalina.....	**48**
TABELA 5	Avaliação dos parâmetros fisiológicos de peso corpóreo e consumo de água e ração de animais oralmente tratados com látex de Janaguba ou HdLP em ensaio de toxicidade aguda.....	**51**
TABELA 6	Avaliação dos parâmetros fisiológicos de produção de excretas de animais oralmente tratados com látex de Janaguba ou HdLP em ensaio de toxicidade aguda.....	**52**
TABELA 7	Pesos absolutos e relativos dos órgãos (fígado, baço, rins) de animais oralmente tratados com látex de Janaguba ou HdLP em ensaio de toxicidade aguda.....	**53**

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ANOVA	Análise de Variância
Cg	Carragenina
DL50	Dose letal mínina que causa a morte de 50% dos indivíduos
EMEA	*European Medicines Agency*
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	*Food and Drug Administration*
GHA	*Globally Harmonised System*
HdLP	*Himatanthus drasticus latex proteins*
Hdp	*Himatanthus drasticus precipitate*
ICH	*International Conference on Harmonisation*
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
iNOS	*Inducible nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintetase induzida)
i.p.	(via) intraperitoneal
i.v.	(via) endovenosa
kDa	KiloDalton
LJ	Leite de Janaguba
NCI	*National Cancer Institute*
NO	*Nitric oxide* (óxido nítrico)
OECD	*Organization for Economic Co-operation and Development*
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	*World Health Organization*

RESUMO

Himatanthus drasticus (Apocynaceae) é uma espécie tradicionalmente utilizada na medicina popular da região nordeste deste país. Sua distribuição ocorre das Guianas ao sudeste do Brasil. O látex desta planta é obtido após uma injúria no caule e amplamente comercializado em mercados públicos. As pessoas ingerem o látex, conhecido como Leite de Janaguba (LJ), para o tratamento e/ou prevenção de diferentes doenças inflamatórias, gastrite, úlcera, câncer, entre outras. Apesar das diversas informações oriundas da medicina popular, não existem relatos científicos suficientes confirmando tais propriedades farmacológicas. Neste trabalho, LJ foi investigado com o propósito de validar sua tão popularmente relatada atividade antiinflamatória. A fração proteica deste látex (HdLP) também foi investigada quanto à presença de atividades antiinflamatória, antinociceptiva, além de seus efeitos toxicológicos. LJ inibiu a resposta inflamatória induzida por carragenina em ratos (98%, $p < 0.05$), assim como o fez a fração HdLP, independente da rota de administração. HdLP reduziu a infiltração de neutrófilos na cavidade peritoneal (96%, $p < 0.05$). Paralelamente a isto, ocorreu o aumento da síntese de óxido nítrico no plasma e a redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF-α) no fluido peritonal. Esta fração também preveniu a vacuolização e hiperplasia das células de Kupfer, causadas pelo efeito da carragenina no fígado. A atividade antiinflamatória está provavelmente associada com a fração proteica de LJ. HdLP exibiu um efeito antiinflamatório mesmo após aquecimento (100 °C, 30 minutos) ou proteólise. Além desta atividade, um efeito pró-inflamatório foi observado após o tratamento com HdLP. Esta também suprimiu contrações abdominais induzidas por ácido acético e reduziu a lambedura de pata induzida por formalina, ambos de maneira dose-dependente. A avaliação da toxicidade aguda demonstrou a ausência de efeitos tóxicos após tratamento com LJ e HdLP (v.o.) mesmo utilizando doses 5000 vezes maiores que as recomendadas. Uma dosagem qualitativa de fitoquímicos em HdLP mostrou a ausência de lupeol e presença de saponinas, taninos e esteróides livres. Entretanto, as propriedades farmacológicas provavelmente não estão relacionadas com estas moléculas. Desta forma, concluímos que o látex de *H. drasticus* exibe duas das atividades farmacológicas relatadas por seus usuários e a fração proteica deste látex é um importante contribuinte para tais propriedades medicinais. A resistência ao aquecimento e à proteólise pode explicar a efetividade de HdLP quando administrada oralmente. A ausência de efeitos tóxicos por via oral torna esta planta uma potencial candidata a fitoterápico. **PALAVRAS-CHAVE:** *Himatanthus drasticus*, látex, antiinflamação; antinocicepção; toxicologia; proteínas laticíferas.

ABSTRACT

Himatanthus drasticus (Apocynaceae) is traditionally used in folk medicine in Northeastern Brazil. The plant is wildly distribuited from Guianas until Southeast Brazil. Latex obtained by cutting its stem bark is mixed with water and extensively sold in public markets. People use Janaguba milk ("Leite de Janaguba"- LJ) to treat or prevent different inflammatory disorders such as gastritis, ulcers as well as cancer, among other uses. Despite, there is not enough scientific data confirming these pharmacological properties.

In this work, Janaguba milk was preliminarily investigated in an attempt to validate its anti-inflammatory activity. Its major protein fraction (HdLP) was assessed for the presence of anti-inflammatory, anti-nociceptive and toxicological effects. LJ inhibited the inflammatory response induced by carrageenan in rats (98%, $p < 0.05$), whereas HdLP did it independent of the route of administration. HdLP significantly reduced the infiltration of neutrophils into the peritoneal cavity (96%, $p < 0.05$) concomitant with increased nitric oxide synthesis in plasma and decrease of pro-inflammatory cytokines IL- 1 and TNF-α in peritoneal fluid. This fraction also prevented vacuolization and Kupfer cell hyperplasia caused by carrageenan in liver. Further, the anti-inflammatory properties were shown to be associated with the protein fraction of LJ. HdLP exhibited anti-inflammation, even after heat-treatment (100 °C, 30 min) or proteolysis. Moreover, a pro-inflammatory effect was observed after HdLP treatment. It also suppressed abdominal constrictions in acetic acid-treated mice and reduced paw licking induced by formalin, both in a dose-dependent manner. An acute toxicological evaluation demonstrated no toxic effects after 14 days from LJ and HdLP administration by oral route even when high doses were tested. A qualitative phytochemical analysis showed the absence of lupeol and presence of saponinas, tannins and free steroids in HdLP. However, pharmacological properties are probably not related to them. It is therefore concluded that the latex of *Himatanthus drasticus* exhibits both the anti-inflammatory and anti-nociceptive activities claimed by its users. The protein fraction of the latex is an important contributor to the pharmacological properties of LJ. Resistance to heat and proteolytic treatment can explain the effectiveness of HdLP even when administered orally. The absence of toxic effects by oral route confirms the potential use of this plant as a phytotherapic agent.

KEYWORDS: *Himatanthus drasticus*, latex, anti-inflammation; anti-nociception; toxicology; latex proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Látex: aspectos gerais

Látex é um termo geral utilizado na designação de qualquer secreção viscosa, geralmente de aspecto leitoso, que é exsudado das plantas imediatamente após uma injúria mecânica (KEKWICK, 2001; KONNO, 2011). Quando exposto ao ar, o látex torna-se pegajoso e coagula rapidamente. O volume de extravasamento pode diferir significativamente mesmo em espécies vegetais do mesmo gênero e família (KONNO, 2011), podendo ser abundante ou de difícil detecção, tanto pela escassa liberação quanto pela cor muito clara (AGRAWAL *et al*., 2008). A cor clara, contudo, não é uma característica geral, visto que esse fluido pode apresentar diferentes colorações, do branco ao marrom-claro, as quais variam de acordo com a espécie da planta (PICKARD, 2007).

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é a espécie mais citada quando há uma referência ao termo látex, visto à sua repercussão no país desde o ciclo da borracha. Grande parte dos estudos sobre látex refere-se a esta espécie, sobretudo devido às inúmeras aplicações da borracha natural, as quais incluem a produção de pneumáticos, tocas de natação, elásticos, luvas médicas, gomas de mascar, brinquedos, entre outros (MORCELI, 2003, UPADHYAY, 2011). Todavia, muitas outras espécies de plantas são laticíferas, sendo algumas das mais citadas as pertencentes às famílias Sapotaceae, Apocynaceae, Caricaceae e Euphorbiaceae (RAMOS *et al*., 2010).

Mais de 20.000 espécies de angiospermas, pertencentes a 900 gêneros, distribuídas em 40 famílias são reconhecidas por possuírem látex (METCALF, 1967; FARRELL *et al*., 1991; LEWINSOHN, 1991; HUNTER, 1994), podendo este ser considerado um fluido extremamente comum no reino vegetal. Estes dados indicam que aproximadamente 10% das plantas conhecidas são laticíferas e que esta é uma característica convergente, ou seja, evoluiu múltiplas vezes e de forma independente (AGRAWAL e KONNO, 2009). Algumas espécies de fungos, gimnospermas e pteridófitas também são produtoras de látex (METCALF, 1967).

Por definição, látex é o exsudado citoplasmático de células altamente especializadas, denominadas laticíferos (METCALF, 1967), os quais podem ser encontrados em raízes, caules, pecíolos e folhas. Estas células são divididas em articuladas e não articuladas (MAHLBERG, 1993). Os laticíferos articulados são cadeias longitudinais de muitas células em que as paredes celulares que separam as células individuais são completamente intactas ou

parcialmente perfuradas. As perfurações laterais entre as paredes celulares podem gerar anastomoses entre os laticíferos adjacentes. Em contraste, os laticíferos não articulados são originados de uma única célula que cresce dentro dos espaços intracelulares, eventualmente ramificando-se nos tecidos da planta de um modo similar as hifas de fungo (HAGEL *et al.*, 2008). A figura 1 apresenta o perfil anatômico de alguns laticíferos.

Na planta adulta, laticíferos articulados e não articulados são morfologicamente similares, porque as perfurações entre os laticíferos centrais aparentam ser uma única célula. Ambos estão geralmente associados a tecidos vasculares (HAGEL *et al.*, 2008).

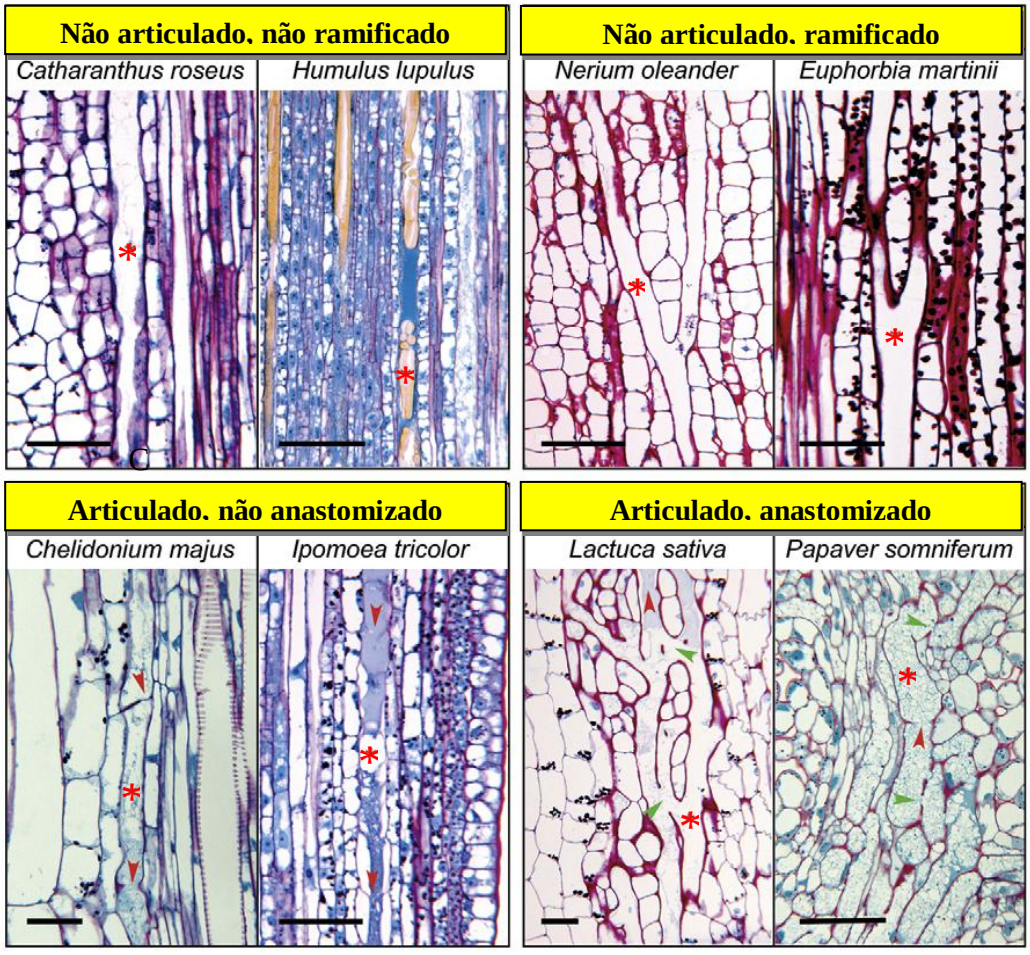

Figura 1 – Perfil anatômico dos quatro tipos de laticíferos (marcados com asterisco vermelho) mostrado por meio de corte longitudinal do caule (ou do carpelo, nos casos de *Lactuca sativa* e *Papaver somniferum*). As setas vermelhas mostram os pontos de articulação entre os laticíferos centrais, enquanto as setas verdes identificam anastomoses na parede longitudinal entre laticíferos adjacentes. As barras de escala representam 60mm. Fonte: HAGEL *et al.*, 2008.

1.2. Composição química do látex

Fluidos laticíferos possuem uma imensa diversidade de constituintes, principalmente relacionados à defesa, os quais vão de metabólitos secundários a proteínas. Dentro desta complexa mistura podem ser identificados: componentes celulares, proteínas enzimáticas e não-enzimáticas, terpenos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios, aminoácidos (MORCELLE *et al*., 2004), além dos componentes de elevada massa molecular, como os polímeros de isopreno que evidenciam a borracha (KEKWICK, 2001).

Dentre os vários tipos de proteínas presentes em látex podemos citar: fosfatase (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1987); beta-1,3- glucanase (CHEYE e CHEUNG, 1995); lectinas (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1986a; WITITSUWANNAKUL *et al*., 2008); peroxidases (PATEL *et al*., 2008; SETHI *et al*., 2009); quitinases (WASANO *et al*., 2009; KITAJIMA *et al*., 2010); inibidores de proteases (WALZ *et al*., 2004; SRITANYARAT *et al*., 2006; RAMOS *et al*., 2010); osmotina (FREITAS *et al*., 2011); além de muitas outras.

Látex é também uma reconhecida rica fonte de enzimas proteolíticas. Muitas destas proteases já foram descritas na literatura, sendo algumas delas as euphorbaínas, proteases do tipo serínicas presentes em diversas espécies de *Euphorbia* (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1985); hevaminas, proteases similares presentes em *H. brasiliensis* (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1986b); papaína e quimopapaína, proteases do tipo cisteínicas presentes em *Carica papaya* (MOUSSAOUI *et al*., 2001); além de proteases presentes em *Calotropis procera*, tais como a proceraína (KUMAR e JAGANNADHAM, 2002), calotropina (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003) e proceraína B (SINGH *et al*., 2010).

1.3. Papel fisiológico do látex

O papel fisiológico desempenhado pelo látex na planta ainda não está totalmente esclarecido, porém a maioria das evidências sugere que ele possui um papel de defesa, sobretudo contra insetos herbívoros (KONNO, 2011). A alta quantidade de fluido exsudado logo após danos causados por insetos (DUSSOURD e DENNO, 1991), assim como a capacidade de imobilizar alguns artrópodes por meio de uma propriedade colante (MOURSY, 1997) são alguns dos dados que reforçam esta hipótese de que látex seja um eficiente mecanismo de defesa mecânica contra insetos. Além disto, a presença de quitinases e

proteases em vacúolos laticíferos sugerem que estas moléculas podem estar envolvidas também na defesa contra patógenos e parasitas (VIERSTRA, 1996).

O primeiro relato de moléculas oriundas de látex desempenhando papel defensivo contra insetos foi citado por Konno e colaboradores (2004). Neste caso, papaína e ficina, proteases cisteínicas dos látex de *Carica papaya* e *Ficus* spp., demonstraram forte toxicidade a larvas da ordem Lepdoptera. Proteases em geral são bastante tóxicas para insetos, desta forma, estando elas presentes em uma ampla variedade de famílias de plantas laticíferas é possível que tais moléculas atuem como defesa contra estes predadores (KONNO, 2011).

Alguns outros exemplos mencionados na literatura são: a relação entre algumas proteínas do látex de *Hevea brasiliensis* e a defesa contra insetos (POSCH *et al*., 1996) e fungos (GIORDANI *et al*., 2002); o envolvimento de látex na defesa de diferentes plantas contra seis insetos da ordem Lepdoptera (KONNO *et al.*, 2004); a atividade do látex de *Ficus microcarpa* contra algumas espécies de fungos (TAIRA *et al*., 2005); a toxicidade de proteínas do látex de *Calotropis procera* sobre diferentes pragas agrícolas (RAMOS *et al*., 2007, RAMOS *et al*., 2010), sobre o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* (RAMOS *et al*., 2009b), na defesa contra fungos fitopatogênicos (SOUZA, 2010; FREITAS *et al*., 2011).

1.4. Etnofarmacologia: o uso das plantas medicinais a partir do conhecimento popular

Existem várias definições para o termo etnofarmacologia, as quais dependem muito da visão dos autores sobre que tipo de recursos a população faz uso no contexto medicinal. Albuquerque e Hanazaki (2006) definem etnofarmacologia como sendo o estudo de preparados tradicionais utilizados em sistemas de saúde e doença, os quais incluem plantas, animais, fungos ou minerais sendo utilizados isoladamente ou em conjunto. Outra visão para a etnofarmacologia, a qual amplia a definição anterior, defende que seu objetivo é avaliar a eficácia das técnicas "tradicionais" fazendo uso de um grande número de modelos farmacológicos (WALLER, 1993).

O uso de plantas para a prevenção e tratamento de doenças é uma prática bastante antiga em todo o planeta. Por vezes, a medicina natural representa a única alternativa terapêutica para muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al*., 2002), assim como para as populações de baixa renda, que tem limitado acesso aos fármacos comerciais. Todavia, a eficácia limitada ou os efeitos colaterais de alguns medicamentos industriais também tem motivado o uso de produtos naturais mesmo nas populações mais ricas.

O sucesso no uso de parte de plantas (folhas, caules, látex, raízes e flores) e seus extratos no combate às doenças dá a essas o status de plantas medicinais. A tradicional medicina chinesa e o sistema Ayurveda são os maiores exemplos de uso etnofarmacológico de plantas (KO, 1999; MISHRA, 2004). Plantas laticíferas também são amplamente utilizadas em comunidades tribais para diversos fins, como: cicatrização, dores nas articulações ou controle de verminoses (UPADHYAY, 2011).

Muitos estudos vêm contribuindo com informações relevantes sobre caracterização química e/ou mecanismos de ação de princípios ativos oriundos de produtos naturais, visto que estes tem um imenso impacto na medicina moderna. Além de fornecer fármacos de difícil produção sintética, como a morfina (isolada de *Papaver somniferum*), as plantas medicinais também fornecem compostos que, depois de modificados via sintética química, tornam-se mais efetivos e menos tóxicos; assim como também fornecem compostos modelos para a obtenção de fármacos terapeuticamente similares aos compostos originais (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Apesar dos avanços obtidos no conhecimento sobre plantas medicinais, um número significativo delas permanece sendo explorado pela população sem nenhuma validação científica. A crença de que "o que é natural não faz mal" ainda faz com que muitas destas plantas sejam comercializadas sem nenhuma avaliação sobre uma possível toxicidade ou outro efeito adverso (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Diante disto, órgãos de vigilância sanitária de medicamentos (FDA, EMEA), instituições de harmonização (ICH, OECD) e de interesse na área (NCI, WHO) foram criados no intuito de normatizar estes medicamentos naturais com relação a real eficácia e segurança na sua utilização (SOBRAL, 2006).

1.5. *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel) e seu uso na medicina popular

Himatanthus drasticus é uma das nove espécies compreendidas pelo gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult na América do Sul, tendo distribuição das Guianas ao sudeste do Brasil (SPINA *et al.*, 2003). É uma espécie pertencente à família Apocynaceae, a qual é um dos destaques na produção de látex (BROCKBANK e LYNN, 1979).

No estado do Ceará, esta planta tem frequente ocorrência na Chapada do Araripe, onde há muitos anos é intensamente explorada pela população local (MODESTO, 1997). Esta espécie pode receber diversos nomes, dependendo da região do país, tais como: Tiborna,

Sebeu-uva, Jasmim-manga, Pau-de-leite, Joanaguba e Sucuúba, porém, no Ceará, é conhecida como Janaguba (PLUMEL, 1991).

H. drasticus é caracterizada como sendo arbórea, com folhagem densa nas extremidades dos ramos, podendo atingir até, aproximadamente, 7 m de altura. Seu fruto tem 12-30 cm de comprimento, é do tipo folículo, cilíndrico, ligeiramente arqueado, em forma de chifre, polispérmico, seco, deiscente e possui uma média de 42 sementes (AMARO *et al.*, 2006). A figura 2 demonstra os aspectos morfológicos da planta e dos frutos, assim como do látex que é comercializado.

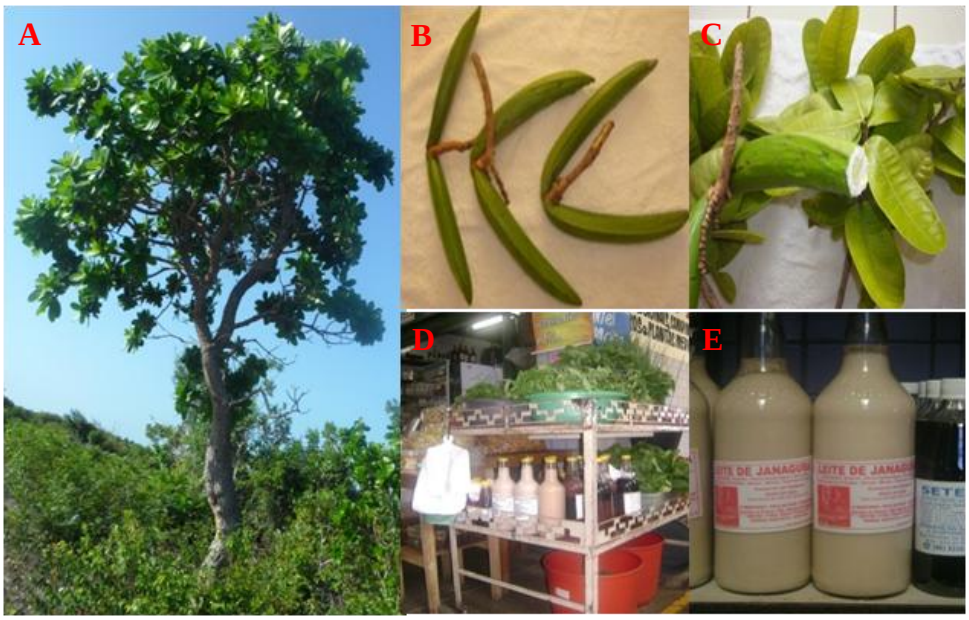

Figura 2 – Representações de *Himatanthus drasticus*. A: *H. drasticus* na fase arbórea; B: Fruto tipo folículo; C: Destaque para a presença de látex no fruto; D: Embalagem comercial do látex, conhecido como Leite de Janaguba (LJ), em um estabelecimento do mercado público São Sebastião, Fortaleza - CE; E: Látex de Janaguba com indicações de uso para os consumidores.

O látex de *H. drasticus*, popularmente conhecido como "Leite de Janaguba", é extraído por meio de incisões no caule em processo similar à extração em *Hevea brasiliensis.* O látex é diluído em água e amplamente comercializado para fins medicinais nos mercados populares do nordeste do Brasil, por aproximadamente 25-30 reais. De acordo com a pesquisa realizada com vendedores da cidade de Fortaleza, as recomendações mais usuais são para o

tratamento de inflamações, câncer, gastrite e úlceras, existindo indicações também para o tratamento de verminoses, diabetes, reumatismo, tuberculose, doenças sexualmente transmissíveis, micoses e hemorroidas. A dose recomendada varia de 30 a 145 mL/ dia, via oral, uma ou duas vezes ao dia. É interessante notar que para algumas enfermidades, como as inflamações, o conhecimento popular diz que o leite de Janaguba tem um efeito curativo. Todavia, para doenças cancerígenas LJ é também utilizado como um remédio preventivo.

H. drasticus não é tão mencionada na literatura científica, como algumas outras espécies deste gênero, apesar dos muitos relatos populares sobre a sua eficácia medicinal. O primeiro estudo científico avaliou os efeitos biológicos do extrato etanólico da casca desta árvore. O extrato foi citotóxico contra artemia, antinociceptivo no teste de contorção induzida por ácido acético em ratos, mas não apresentou efeito antimicrobiano *in vitro* contra *Enterobacter*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* (COLARES *et al*., 2008). De acordo com Leite e colaboradores (2009), o látex de *H. drasticus* é um agente citoprotetor contra úlceras induzidas por etanol em camundongos. O triterpeno lupeol, isolado do látex de *H. drasticus*, mostrou efeitos antiinflamatório e antinociceptivo, de acordo com Lucetti e colaboradores (2010). O extrato das folhas de *H. drasticus* também mostrou-se efetivo no tratamento do turmor Sarcoma 180 (SOUSA *et al*., 2010).

Uma fração majoritariamente proteica do látex de *H. drasticus*, denominada HdLP, vem sendo caracterizada quanto a seus aspectos bioquímicos e farmacológicos pelo nosso grupo de pesquisa. Esta fração foi inicialmente isolada e parcialmente caracterizada por Matos (2010). Neste trabalho, verificou-se que HdLP equivale a 3,1 % do total de massa seca do látex. O teor de nitrogênio total, determinado pelo método de micro-Kjeldahl (BAETHGEN e ALLEY, 1989; AOAC, 1990), e o de proteínas solúveis, determinado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), apresentou uma média de 32,37 mg/mL e 0,133 mg/mL de proteínas, respectivamente. Eletroforeses uni e bidimensionais revelaram que HdLP possui uma concentração bastante evidente de proteínas ácidas e que a maior parte destas proteínas apresentou massa molecular relativa na faixa de 20-30 kDa. A fração proteica foi também submetida à cromatografia iônica em DEAE-Sepharose *fast flow*, apresentando dois picos distintos, denominados PI e PII. Quanto à presença de moléculas relacionadas á defesa vegetal, HdLP apresentou peroxidase, quitinase, superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX), proteases serínicas e inibidores de proteases do tipo cisteínico. Matos (2010) também realizou ensaios biológicos utilizando HdLP contra os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*; e os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Cercospora kikuchii*, todos estes considerados pragas

agrícolas. Embora rica em moléculas de defesa, HdLP não foi capaz de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos testados. Todavia, conseguiu inibir em até 52% o crescimento larval dos insetos testados, quando na dose máxima.

Mousinho e colaboradores (2011) corroboraram o estudo de Sousa e colaboradores (2010) ao estudarem o efeito de *H. drasticus* sobre tumores. Todavia, a fração proteica (HdLP) parece estar envolvida nesta atividade, visto que apresentou efeitos antitumorais e propriedades imunomodulatórias contra os tumores experimentais Sarcoma 180 e carcinosarcoma Walker 256 (MOUSINHO *et al*., 2011). Em 2011, Marques mostrou que o efeito protetor da mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol é desempenhado por HdLP, com o envolvimento das vias do NO/ GMPc/ K_{ATP} e da glutationa nesta atividade.

1.6. Potencial farmacológico de outras espécies de plantas laticíferas

A maioria dos estudos relacionados ao gênero *Himatanthus* está relacionado à anatomia/morfologia vegetal, identificação e detecção de atividades farmacológicas provenientes de compostos secundários, os quais são oriundos do látex, caule ou folhas. Algumas destas atividades já foram descritas: ação antiinflamatória, analgésica, antineoplásica, antiflogística, antimicrobiana, antifúngica, imuno-reguladora e leishmanicida em *H. sucuuba* (Spruce) Woodson (PERDUE e BLOMSTER, 1978; SILVA *et al*., 1998; MIRANDA *et al*., 2000; WOOD *et al*., 2001; SOUZA *et al*., 2006; CASTILLO *et al*., 2007; SOARES *et al*., 2010). *H. articulatus* (Vahl) Woodson, por sua vez, teve relatos de ação antiinflamatória, analgésica, anti-malária, antitumoral, vermífuga, purgativa, anti-tosse, antifúngico, antiparasitário e antiproliferativa (PERDUE e BLOMSTER, 1978; ELIZABETSKY e CASTILHOS, 1990; MILLIKEN, 1995; MIRANDA *et al.*, 2000; MESQUITA *et al.*, 2005; SEQUEIRA *et al*., 2009; REBOUÇAS *et al*., 2011). Para *H. lancifolius* as propriedades descritas foram: antimicrobianas, gastroprotetoras, antiespasmódica, antioxidante e antiinflamatórias (SOUZA *et al*., 2004; BAGGIO *et al*., 2005; RATTMANN *et al.*, 2005; SOUZA *et al*., 2007; NARDIN *et al*., 2008). Estas atividades são potencialmente passíveis de serem encontradas em *H. drasticus* devido à proximidade filogenética, entretanto esta espécie ainda não é tão relatada na literatura científica como algumas de seu gênero.

A espécie *Calotropis procera* é umas das espécies de plantas laticíferas mais descritas.

Atividades antiinflamatórias foram encontradas em extratos das flores (MASCOLO *et al.*, 1988), raízes (BASU e CHAUDHURI, 1991) e extratos obtidos do látex íntegro (KUMAR e BASU, 1994; ARYA e KUMAR, 2005). Estes últimos também apresentaram atividade pró-inflamatória (SINGH *et al.*, 2000), sendo esta relacionada com a liberação dos mediadores histamina, serotonina e prostaglandina (SHIVKAR e KUMAR, 2003; KUMAR e SHIVKAR, 2004); assim como também atividade antinociceptiva (DEWAN *et al.*, 2000). A partir do trabalho de Alencar e colaboradores (2004), iniciaram-se estudos com a fração proteica do látex de *C. procera*. Este trabalho relatou a ação antiinflamatória destas proteínas em diversos modelos animais (ALENCAR *et al.*, 2004) e, posteriormente, a mesma fração também desempenhou uma atividade antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005). Desde então, muitas outras atividades relacionadas às proteínas deste látex foram descritas, tais como: inibição de crescimento tumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2010), atividade anti-séptica (LIMA-FILHO *et al.*, 2010) e coagulante em animais submetidos à sepse (RAMOS *et al.*, 2012).

Melo e colaboradores (2008) relataram atividades cicatrizante e anti-úlcera em animais tratados com o látex de *Carica candamarcensis*, sugerindo o envolvimento de proteases cisteínicas nestas atividades. Atividade anti-viral (VIJAYAN *et al.*, 2004) e pró-inflamatória (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009) também foram encontradas no látex de *Cryptostegia grandiflora*, esta última tendo sido encontrada na fração proteica. O látex de plantas do gênero *Euphorbia* também apresentam atividade antiinflamatória (BANI *et al.*, 2000; FERNANDEZ-ARCHE *et al.*, 2010), citotóxica e anti-viral (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2002).

1.7. A resposta inflamatória

Quando um organismo sofre algum tipo de dano tecidual, seja este provocado por lesões, infecções ou distúrbios orgânicos, um complexo processo biológico chamado inflamação é desencadeado. Este processo é classicamente caracterizado por quatro sinais clínicos, os quais foram inicialmente descritos por Cornelius Celsus, no início da era cristã: rubor, calor, edema e dor. Rudolf Virchow adicionou o quinto sinal (perda da função), no século XIX (MONTENEGRO e FRANCO, 1999). A resposta inflamatória envolve uma série de componentes vasculares, celulares e solúveis, os quais levam a alterações (nos vasos sanguíneos, tecidos e fluidos internos) cuja finalidade é remover o estímulo indutor da

inflamação e reparar o dano provocado por este (ABBAS *et al*., 2008; VILCEK e FELDMAN, 2004).

A resposta inflamatória é dividida em duas fases denominadas: aguda e crônica. A primeira (inflamação aguda) inicia-se rapidamente logo após a indução do estímulo danoso e sua duração é de algumas horas. Esta fase é caracterizada pela migração e ativação de leucócitos (principalmente neutrófilos) para o sítio da inflamação, extravasamento de proteínas plasmáticas, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular no local, além de uma possível ativação da cascata de coagulação, eventos estes que acabam por manifestar os sinais clínicos clássicos (CONTRAN *et al*., 1999; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A ocorrência da inflamação crônica, por sua vez, depende da eliminação do estímulo desencadeador durante a fase aguda, ou seja, ocorre apenas se o processo não for resolvido na fase anterior. A fase crônica tem, geralmente, uma prolongada duração e caracteriza-se pela presença de macrófagos e linfócitos, proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo na tentativa de reparo do tecido e, algumas vezes, destruição tecidual (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985; BROIDE, 1991).

A resposta inflamatória como um todo, ou seja, englobando ambas as fases, ainda pode ser dividida em eventos vasculares e celulares. Segundo Pelaia e colaboradores (2003), estes eventos são direcionados e amplificados por diversas substâncias de caráter multifuncional, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e seus derivados.

1.7.1. Eventos vasculares

Imediatamente após uma lesão, a rede tecidual lesionada sofre uma vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas, histamina, bradicinina e serotonina, as quais são liberadas por mastócitos e monócitos alguns minutos após a agressão (MOTA *et al*., 2006). Estes processos geram os sinais clínicos de calor e rubor.

As modificações nos vasos de pequeno calibre permitem a passagem de eletrólitos e pequenas moléculas (transudato) e, posteriormente, de moléculas maiores, como albumina e fibrinogênio (exsudato). A saída destas moléculas, acompanhada da saída de água, para o espaço extravascular geram o chamado edema. Ao ser extravasado, o exsudato marginaliza os leucócitos circulantes (fazendo-os circular junto ao endotélio) e, paralelamente, influencia as células adjacentes do endotélio, fazendo-as expressar moléculas de superfície que

favorecem a aderência dos leucócitos e a eventual migração destes para os tecidos (CRUVINEL *et al*., 2010). O processo é acompanhado pela liberação de citocinas inflamatórias (IL-1, TNF-α e quimiocinas) pelos macrófagos residentes no tecido lesado (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). O exsudato também contém os componentes de quatro cascatas enzimáticas do plasma: sistema complemento, sistema da coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (ROBBINS *et al*., 2005).

1.7.2. Eventos celulares

Quando ocorre um processo inflamatório, os macrófagos residentes tentam fagocitar o agente agressor, ao mesmo tempo em que liberam diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos para o recrutamento de leucócitos de diferentes populações para o tecido inflamado, causando edema e dor (FERREIRA, 1980; HOLLAND e MIKOS, 2003). Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o local da injúria, sendo aptas a fagocitar, destruir e degradar os microrganismos, utilizando mecanismos dependentes de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas. Estas células permanecem no sítio inflamatório por 12 a 24 horas e, posteriormente, sofrem apoptose seguida por fagocitose pelos macrófagos. Outros leucócitos (eosinófilos, macrófagos e linfócitos) migram progressivamente para o foco inflamatório a partir da 6ª hora, lá permanecendo por cerca de uma semana. Entretanto, se o agente indutor não for removido, estes leucócitos se multiplicam, iniciando a fase crônica do processo (KASAMA *et al*., 2005). O mecanismo de migração celular do sangue para o local da inflamação é dividido em: marginação, rolamento, adesão, diapedese e migração (IMHOF e DUNON, 1997).

Nas condições normais de fluxo sanguíneo, as células circulam no centro do vaso, visto que a resistência é menor enquanto a velocidade do fluxo é maior. A marginação é causada por mudanças nestas condições usuais da circulação sanguínea. Quando há vasodilatação, ocorre uma redução na velocidade do fluxo sanguíneo e as células circulantes colidem mais frequentemente com as células endoteliais ativadas (que expressam altos níveis de moléculas de adesão da família das selectinas, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1)). Estas moléculas medeiam uma adesão de baixa afinidade entre leucócitos e endotélio, contudo suficiente para atrair os leucócitos para uma posição periférica ao longo da superfície endotelial (ABBAS *et al*., 2008). Essa adesão de baixa afinidade é de dissociação rápida, fazendo com que os neutrófilos rolem na

parede do vaso e sejam expostos a fatores quimiotáticos, como fragmentos de fibrina, colágeno e resíduos do metabolismo bacteriano (CARLOS e HARLAN, 1994). Em seguida, ocorre o processo de forte adesão dos leucócitos. As quimiocinas liberadas estimulam outro conjunto de adesinas presentes na superfície dos leucócitos, as integrinas. Estas moléculas reconhecem os ligantes expressos no endotélio mais avidamente, imobilizando os neutrófilos e promovendo sua aderência à parede do vaso. O passo seguinte dá-se quando, direcionados pelo gradiente crescente de produtos quimiotáticos, os leucócitos inserem extensões entre as junções das células endoteliais, posicionando-se entre estas células e a membrana basal, processo denominado diapedese. Por fim, os leucócitos atravessam a membrana e alcançam o espaço extravascular (ROBBINS *et al.*, 2004). Este processo pode ser visualizado na figura 3.

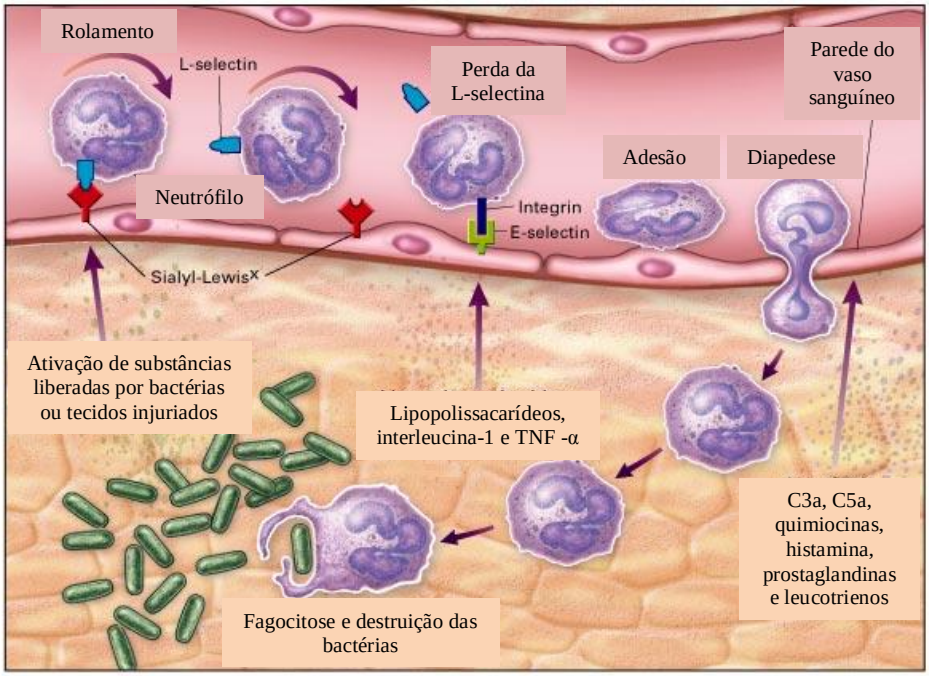

Figura 3 – Representação da resposta inflamatória do organismo diante de um dano tecidual e/ou infecção bacteriana. As substâncias liberadas pelos agentes indutores ativam os eventos vasculares e celulares da inflamação. Fonte: www.chronicprostatitis.com/images/f3.jpg (Acesso em 16/01/2013).

1.7.3. Mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória

Segundo Larsen e Henson (1983), um mediador químico é considerado qualquer substância que, atuando nos vasos sanguíneos e/ou células, contribui para uma resposta celular que pode ser ou não do tipo inflamatória. Os mediadores químicos da inflamação podem ser de origem plasmática ou tecidual (SIQUEIRA e DANTAS, 2000). Dentre os mediadores de origem tecidual estão o óxido nítrico e as citocinas, os quais serão discutidos neste trabalho.

1.7.3.1. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre sintetizado a partir de L-arginina e oxigênio molecular, numa reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), utilizando NADPH como um cofator (PALMER *et al.*, 1987) e liberando L-citrulina como co-produto (IGNARRO, 2002). Quando em condições atmosféricas NO é um gás, mas dentro das células e tecidos ele é um soluto (COLEMAN, 2001).

No contexto da inflamação, NO desempenha uma importante função de mediador e regulador desta resposta (SALVEMINI *et al*., 2003) agindo primariamente na migração de leucócitos no sítio da inflamação (IALENTI *et al*., 2000), mas também na regulação do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular (SCHWENTER *et al*., 2002; MULLA *et al*., 2010) e aumento da vasodilatação (STOWE *et al*., 2001; WOTHERSPOON *et al*., 2005; YOUSIF, 2005). O óxido nítrico também pode interagir com espécies reativas de oxigênio, gerando peroxinitrito, S-nitrosotiois e o dióxido de nitrogênio, os quais agem como metabólitos antimicrobianos (MULLIGAN *et al*., 1993). Além disso, NO reduz a agregação e adesão plaquetária e é citotóxico para determinados micróbios e células tumorais (SCHWENTER *et al*., 2002; ROBBINS *et al*., 2005).

Apesar destes efeitos, o papel do NO na inflamação ainda é incerto, podendo ser uma molécula pró ou antiinflamatória, dependendo da quantidade de NO liberado no local da inflamação. Algumas evidências indicam que o aumento na produção de NO ocorre devido a indução da expressão de iNOS (NOS induzida) por meio de citocinas inflamatórias (PACHER *et al*., 2007). De acordo com Ross e Reske-Kunz (2001), em baixas concentrações o NO é pró-inflamatório, induzindo vasodilatação e recrutamento de neutrófilos. Contudo, em altas

concentrações, NO reprime a expressão das moléculas de adesão, suprime a ativação e induz a apoptose de células inflamatórias, atuando, portanto, como um antiinflamatório.

Análogos estruturais da L-arginina, estão entre os principais inibidores das iNOS, visto que competem com o substrato L-arginina pelo sítio de ligação nas NOS. L-N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) e N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) inibem isoformas constitutivas e induzidas de NOS (iNOS). Embora esses análogos estruturais da L-arginina sejam potentes inibidores das iNOS, normalmente demonstram pouca seletividade para as distintas isoformas da NOS (REES *et al*., 1990; GUZIK *et al*., 2003). Por sua vez, agentes não análogos da L-arginina, tais como as aminoguanidinas (AMINO) e as alquilisotiuréias, são inibidores seletivos da iNOS (CORBETT *et al*., 1992; GUZIK *et al*., 2003). Inibidores deste tipo estão sendo arduamente investigados como possíveis estratégias terapêuticas para a prevenção do desenvolvimento de SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) e MODS (síndrome da disfunção múltipla de órgãos) (McDONALD *et al*., 2002), além de tratamento para a doença de Parkinson (KOPPULA *et al*., 2012).

1.7.3.2. Citocinas

As citocinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas moduladoras que, em condições normais do organismo, são detectadas em baixas concentrações no sangue e nos fluidos biológicos, mas que durante processos inflamatórios podem alcançar concentrações milhares de vezes maiores (JANEWAY e TRAVERS, 2006). Estas proteínas são basicamente produzidas por leucócitos ativados, todavia, células *natural killer* (NK) também podem produzi-las (FRENCH e YOKOYAMA, 2003).

Quando há uma variação de estímulo, as citocinas ativam seus receptores de superfície e desencadeiam a ativação de mensageiros secundários e vias de transdução de sinais dentro das células (SMITH e HUMPHRIES, 2009) na tentativa de mediar informações, bem como modular a função destas células (HOLLOWAY *et al*., 2002). A rede de ativação destas moléculas é altamente regulada, visto que os níveis de secreção voltam ao nível basal após a remoção do estímulo. Estes níveis de concentração basais e de secreção são ainda variáveis entre indivíduos, sendo intimamente relacionados com influências genéticas e ambientais (SMITH e HUMPHRIES, 2009). Além de exercerem ação direta sobre as células, as citocinas podem induzir a formação e/ou estimular a expressão de receptores de superfície de outras citocinas (promovendo uma amplificação do sinal), assim como também apresentam

interações sinérgicas ou antagônicas entre si (ROBBINS *et al*., 2004; LAWRENCE *et al*., 2006).

As citocinas são classificadas em interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda conforme sua atividade biológica como: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF-α e TGF-β) e antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-4 e IL-10) (CAVAILLON, 2001; WONG *et al*., 2003).

No contexto da inflamação, TNF-α está envolvido no recrutamento de neutrófilos para o foco da inflamação ao promover a síntese e liberação quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes (FACCIOLI *et al*., 1990; SAUNDERS *et al*., 2005). Esta citocina também estimula a secreção de IL-1, sendo um dos exemplos de uma cascata de citocinas que possuem atividades biológicas semelhantes ou complementares (ABBAS *et al*., 2008). TNF-α é uma das citocinas mais estudadas com relação a doenças autoimune e infecciosas (SMITH e HUMPHRIES, 2009).

Como dito anteriormente, IL-1 tem ação semelhante à TNF-α e também induz a síntese e secreção de moléculas quimioatrativas, induzindo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (FACCIOLI *et al*., 1990). Esta ação pró-inflamatória dá-se, prioritariamente, pela indução de cicloxigenase tipo 2 e aumento da expressão de moléculas de adesão (DINARELLO, 2009). Quando em baixas concentrações, IL-1 atua como um mediador local da inflamação, agindo na superfície das células endoteliais para aumentar a expressão de moléculas de adesão. Já em altas concentrações, esta citocina provoca febre no indivíduo, além de induzir a síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado (ABBAS *et al*., 2008).

A citocina IL-10 possui um papel extremamente importante na regulação do processo inflamatório. Sua principal função é limitar e, por fim, finalizar a inflamação por meio da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disto, IL-10 é também uma citocina multifuncional, regulando o crescimento, diferenciação e função de diversas células do sistema hematopoiético (MOORE *et al*., 2001). Altas concentrações de IL-10 estão usualmente associadas com doenças, como: asma, lúpus sistêmico eritematoso e suscetibilidade a outras do tipo infeccioso (SMITH e HUMPHRIES, 2009).

1.8. Dor e nocicepção

De acordo com a IASP – *International Association for the Study of Pain* (2013), a definição de mais adequada para dor seria a de uma desagradável sensação sensorial e emocional associada a danos teciduais reais ou potenciais, ou descrita em relação a tais danos. A dor está relacionada ao lado subjetivo da mente, desta forma, um estímulo nocivo nas terminações nervosas (nociceptores) não é definido como dor e sim nocicepção, a qual é o processo neural de codificação do estímulo nocivo.

Considerando o tipo de lesão e/ou mediadores envolvidos, a dor pode ser ainda classificada como: neurogênica (quando a lesão ocorre diretamente no tecido neural), nociceptiva (quando ocorre uma estimulação nos receptores nociceptivos após contato com substâncias químicas, a ponto de causar danos nestes), neuropática (quando ocorre uma disfunção no processamento neural, gerando respostas anormais), inflamatória (resultante da sensibilização dos neurônios por meio da ação da cascata de citocinas no foco da inflamação) ou psicogênica (decorrente de problemas psicológicos) (MILLAN, 1999; RANG *et al*., 2003).

Considerando estes aspectos, um composto antinociceptivo seria aquele capaz de modificar o limiar de excitação dos nociceptores fazendo com que estes respondam ao estímulo de forma tardia ou até mesmo não respondam. A classificação destes compostos é geralmente baseada no mecanismo de ação, o qual pode ser via sistema nervoso central ou periférico (SILVA *et al*., 2010).

Não é raro de se encontrar na literatura compostos apresentando efeitos antinociceptivos e, ao mesmo tempo, tendo um princípio antiinflamatório. Uma relação intrínseca entre estas atividades é considerada bastante provável (SOARES *et al*., 2005; YU *et al*., 2012). Desta forma, moléculas que atuam como potenciais antiinflamatórios também podem ser utilizadas em tratamentos de analgesia, quando a dor em questão caracteriza-se como do tipo inflamatória.

2. JUSTIFICATIVA

A necessidade de validação científica de plantas medicinais ganha importância visto o impacto que estas têm na medicina moderna e na indústria farmacêutica. O uso destas plantas é principalmente difundido pelo conhecimento popular, o qual se torna um aliado na prospecção de novos compostos com potencial farmacológico.

A utilização de plantas medicinais como prevenção e/ou tratamento de doenças é bastante recorrente, sendo, todavia, predominante dentro das populações mais carentes. Neste contexto, é crescente a pesquisa por extratos ou moléculas purificadas oriundas de plantas, as quais possam ser utilizadas como fitoterápicos ou fármacos. Dentre os "pacientes-alvo" para estes novos medicamentos oriundos de plantas estão aqueles que possuem doenças ainda não totalmente revertidas pelos fármacos atualmente disponíveis ou os que sofrem com os efeitos colaterais decorrentes do uso destes. Nesta perspectiva, alguns dos exemplos seriam as doenças com elevados índices de ocorrência, como as doenças inflamatórias ou que possuem processos inflamatórios nos seus sintomas, como o câncer.

Além destas observações, é importante ressaltar a relevância das pesquisas com *H. drasticus*, uma espécie bastante explorada na região nordestina (sobretudo no Ceará) e que não possui muitos relatos na literatura científica. O estudo aprofundado de uma espécie gera conhecimento, favorece a preservação e facilita a produção de produtos biotecnológicos.

Com base no problema exposto, o látex *H. drasticus* foi escolhido para a avaliação de sua potencial ação farmacológica por representar uma excelente fonte de látex, facilmente encontrada nos mercados populares da cidade, e ser uma espécie reconhecida na medicina popular, porém sem muitos relatos na literatura científica.

3. HIPÓTESE

Considerando o exposto sobre as atividades farmacológicas de *Himatanthus drasticus*, temos como hipótese que uma fração majoritariamente proteica do látex desta espécie está envolvida no desenvolvimento de atividades biológicas capazes de inibir fenômenos biológicos, tais como a inflamação e a nocicepção, não apresentando toxicidade aguda para os usuários.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho tem como proposta a validação etnofarmacológica do uso popular do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, assim como, baseado nos dados de caracterização bioquímica de uma fração proteica deste látex, investigar o envolvimento desta na realização das atividades farmacológicas e propor um possível mecanismo de ação para estas moléculas.

Objetivos específicos

- Verificar a veracidade do uso popular do látex de *H. drasticus* como um antiinflamatório através de modelos clássicos de inflamação, utilizando as mesmas recomendações de uso da medicina popular;
- Analisar o perfil fitoquímico da fração a fim de verificar que moléculas poderiam estar envolvidas no desenvolvimento das atividades biológicas;
- Investigar se uma fração proteica deste látex detém as moléculas promotoras de atividades farmacológicas, utilizando as vias oral (mesma usada na medicina popular) e/ou endovenosa;
- Analisar a participação de mediadores da inflamação, como óxido nítrico e citocinas, na realização desta atividade;

- Averiguar efeitos de toxicidade aguda quando animais ingerem o látex coletado em água e a fração proteica deste por via oral, bem como realizar análises histopatológicas nos órgãos dos animais submetidos a tratamento com a fração do látex;
- Investigar a ação antiinflamatória no pico cromatográfico oriundo da fração proteica, bem como a persistência da atividade quando esta fração é submetida à digestão enzimática e tratamento térmico;
- Investigar a presença de outra atividade farmacológica, como a antinociceptiva, na fração do látex.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Reagentes e fármacos

Lupeol, carragenina, tween-20, pronase (uma mistura de proteases de *Streptomyces griseus*), marcadores de massa molecular, matrizes cromatográficas DEAE-Sepharose *fast-flow*, membranas de diálise *cut-off* 8 kDa foram obtidos de Sigma ou Sigma-Aldrich Co., USA. Morfina e diazepan foram obtidos de Cristália (RJ, Brasil) e kits de anticorpos de R&D Systems. Kit Panótico Rápido de coloração de células foi obtido da Laborclin. Os reagentes para eletroforese foram obtidos de G&E HealthCare, São Paulo, Brasil.

Os demais reagentes, como: Halotano, EDTA, ácidos, bases, soluções salinas e tampões foram adquiridos em indústrias locais e/ ou preparados a partir de reagentes de grau analítico.

5.2. Material Vegetal

A planta da qual foi feita a coleta do fluido laticífero é da espécie *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, pertencente à família Apocynaceae. O espécime está localizado no bairro Edson Queiroz, na cidade de Fortaleza, nas seguintes coordenadas geográficas: 3°46’59.45”S/38°28’00.87”OW. A exsicata foi identificada com o número 40408 pelo taxonomista Edson Paulo Nunes e está depositada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará.

5.3. Coleta do látex

A fim de conhecer o processo de coleta, comercialização e indicações etnofarmacológicas do látex de *Himatanthus drasticus* (Janaguba), foi realizada uma pesquisa etnobotânica com 10 comerciantes de produtos naturais do centro de Fortaleza.

As garrafas com “leite de Janaguba” vendidas no centro da cidade eram oriundas de várias cidades do Ceará (Crato, Aquiraz, Sobral, Pacajus, Eusébio, Caucaia, entre outras).

Nenhum dos comerciantes era o coletor, porém a maioria deles tinha conhecimento dos processos de coleta e preparação.

Segundo os relatos, é feita uma injúria no caule e o látex começa a gotejar. Uma vasilha, esponja ou algodão são utilizados para a coleta. O látex é, então, diluído em água na proporção 1:1 (v/v). Não houve indicações específicas sobre a época do ano em que a coleta seria mais favorável (estação seca ou chuvosa), contudo, alguns comerciantes citaram que o látex coletado durante a estação chuvosa pode estragar mais rapidamente. O período do dia mais indicado para a coleta é de manhã bem cedo, porque o gotejamento é mais acentuado.

Após a coleta, o látex de Janaguba é comercializado em garrafas de 1 litro, as quais ficam expostas em ambientes diversos com temperaturas variando entre 25-35 °C, dependendo do período do dia. Em posse de tais informações e verificando que alguns vendedores comercializam outras preparações afirmando ser o látex de Janaguba, um antigo coletor e comerciante de leite de Janaguba foi escolhido como o único fornecedor das garrafas com látex. Este procedimento garantiu a veracidade do uso do látex de *Himatanthus drasticus*, assim como a qualidade na reprodução dos experimentos. Apenas látex recém-coletado foi utilizado neste estudo.

5.4. Fracionamento do fluido laticífero

O látex recém-coletado, segundo o descrito acima, foi inicialmente submetido à centrifugação (8.680 x *g*, 25 minutos, 10 ºC). Este procedimento permitiu a precipitação da fração insolúvel rica em polímeros de isopreno (borracha), a qual foi denominada “Hdp” (*Himatanthus drasticus precipitate*). Tal fração foi posteriormente analisada. O sobrenadante obtido foi exaustivamente dialisado contra água destilada por 72 horas, a 25 ºC, sob suave agitação. Após a primeira hora de diálise (volume 1:1) a fração não retida pela membrana de diálise (8 kDa) foi coletada e denominada “Água da diálise”. Esta fração é constituída por metabólitos hidrofílicos e de pequeno tamanho molecular (Mr < 8 kDa). A fração retida no interior da membrana de diálise foi novamente centrifugada, nas condições anteriormente descritas; o sobrenadante foi recuperado e liofilizado. Esta fração, rica em macromoléculas solúveis e ausente de borracha, foi denominada “HdLP” (*Himatanthus drasticus latex proteins*) e utilizada nos ensaios biológicos (Figura 4).

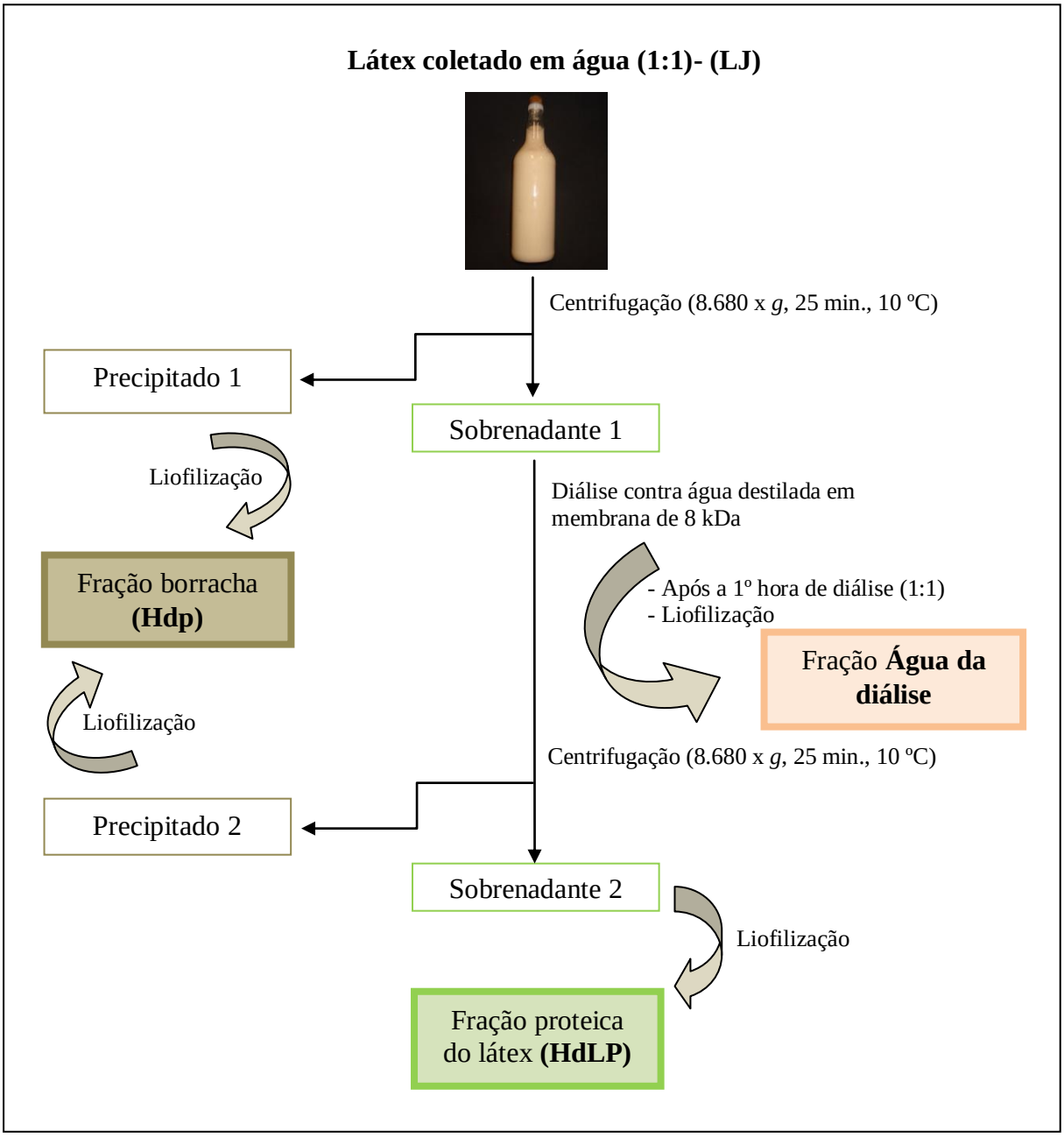

Figura 4 – Esquema do fracionamento do látex de *H. drasticus*, do qual resultaram três frações distintas.

5.5. Caracterização bioquímica

A caracterização dos componentes do látex, determinação da quantidade de proteínas e semi-purificação da fração HdLP por meio de cromatografias e eletroforeses uni e bidimensionais foram realizada no trabalho de Matos (2010). Quando necessário, as etapas foram novamente realizadas neste trabalho.

5.5.1. Cromatografia de troca iônica

As proteínas do látex foram submetidas a fracionamento cromatográfico em coluna DEAE-Sepharose *fast flow* a fim de se obter maiores quantidades dos picos cromatográficos. Para tal processo, 70 mg de HdLP foram dissolvidos em 5 mL de tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 5,0 e centrifugados a 3250 x *g*, 30 minutos, 10 °C. O tampão de eluição do pico não retido na matriz cromatográfica foi Acetato de Sódio 50 mM pH 5,0. Para determinar a concentração do tampão de eluição do pico retido na matriz foi realizado um gradiente de eluição *stepwise*, onde a amostra foi eluída com tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo NaCl de 0-1M. Após este processo, constatou-se que o tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 5,0 contendo NaCl 250 mM era o mais adequado para esta etapa do processo cromatográfico. A partir disto, foram gerados dois picos cromatográficos, PI (não retido na coluna) e PII (retido na coluna), os quais foram caracterizados por eletroforese na presença de SDS (SDS-PAGE).

5.5.2. Cromatografia em camada delgada

A fim de verificar a presença do triterpeno lupeol na fração HdLP, foi realizada uma cromatografia em camada delgada em placa de sílica. Uma amostra de 1 mg de HdLP foi dissolvida em diclorometano e 20 µL desta solução foram aplicados na placa de sílica. Lupeol purificado (20 µL) foi utilizado como controle positivo. A placa foi imersa no reagente revelador vanilina (P.A.) e incubada a 50 °C, por 5 minutos. A migração das amostras foi verificada por meio da visualização em um gradiente ascendente na placa, o que permitiu o cálculo do fator de retenção (R_f) de cada amostra. Para calcular este fator foi medida a distância entre a linha de aplicação da amostra e a linha de chegada da fase móvel para encontrar um valor *X*. Em seguida, marcou-se a distância de cada ponto de amostra (visualizada como uma mancha) até a linha inicial de aplicação e este valor foi dividido pelo valor de *X*. O fator de retenção do lupeol foi 0,75.

5.5.3. Perfil qualitativo de fitoquímicos

O perfil fitoquímico da fração HdLP foi realizado segundo o protocolo de Matos (1997). Para tanto, HdLP (25 mg/mL) foi inicialmente solubilizada em etanol 95%, utilizando um sonicador, e o sobrenadante obtido foi a solução-mãe para cada ensaio específico.

5.5.3.1. Teste para fenóis e taninos

A uma alíquota de 3 mL da solução-mãe foram adicionadas 3 gotas (60 µL) de solução alcoólica de $FeCl_3$ 2%. Uma coloração variável azul-avermelhada é indicativa da presença de fenóis. Por sua vez, um precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto um precipitado verde indica taninos catéquicos ou condensados.

5.5.3.2. Teste para flavonóides

Alíquotas de 3 mL da solução-mãe foram colocadas em 3 tubos de ensaio. O primeiro tubo foi acidificado com HCl 0,1 M até atingir o pH 3,0; os dois outros tubos foram alcalinizados com NaOH 0,1 M até os pH 8,5 e 11, respectivamente. Os pH foram mensurados em pHmetro. Antocianinas e antocianidinas são identificadas pela coloração vermelha (pH 3,0), lilás (pH 8,5) e azul-púrpura (pH 11). Flavonas, flavonóis e xantonas apresentam uma mudança na coloração para o amarelo, já flavononóis são indicados por um tom laranja-avermelhado, ambos apenas em pH alcalino (pH 11). Chalconas e auronas apresentam cor vermelha (pH 3,0) e vermelho-púrpura (pH 11).

Ao aquecer os tubos acidulados (pH 3,0) e alcalinizados (pH 11) contendo a solução-mãe, identificamos outras subclasses de flavonóides: leucoantocianidinas pela cor vermelha em pH ácido; catequinas pela cor parda em pH ácido; e flavononas pela cor laranja-avermelhada em pH alcalino. Outro ensaio realizado para a detecção de subclasses de flavonóides também foi realizado. Para tal, uma alíquota de 3 mL da solução-mãe foi colocada em 1 tubo de ensaio e 2 pequenas fitas de magnésio foram adicionadas ao tubo, seguida da adição de 0,5 mL de HCl concentrado (solução conhecida como reativo de Cianidina ou Shinoda). A reação do HCl com o magnésio gera uma efervescência, a qual é

caracterizada por uma mudança de cor para o vermelho quando na presença de compostos contendo um núcleo alfa-benzopirona (como flavonóides livres ou condensados).

5.5.3.3. Teste para esteróides e triterpenóides

Para este teste, 250 mg de HdLP foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio, sob agitação. Esta solução foi filtrada e o extrato em clorofórmio foi utilizado neste ensaio. O resíduo retido pela filtração foi reservado para a detecção de saponinas. Ao extrato filtrado foi adicionado 1 mL de anidro acético e, em seguida, 3 gotas (60 µL) de H_2SO_4 concentrado (solução conhecida como reagente de Liebermann-Burchard). A coloração verde persistente indica a presença de esteróides livres; se a coloração for parda ou vermelha é um indicativo para a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

5.5.3.4. Teste para saponinas

O resíduo reservado no teste anterior foi ressuspendido em 5 mL de água destilada e levemente agitado por 3 minutos. Saponinas são identificadas pela formação de um anel de espuma persistente na superfície do líquido.

5.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A fração HdLP submetida a aquecimento a 100 ºC e tratamento enzimático com pronase (estas metodologias estão apresentadas posteriormente neste trabalho), foi avaliada por eletroforese em uma dimensão, metodologia baseada no trabalho de Laemmli (1970). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% de glicerol, na presença de 2-mercaptoetanol, o qual foi ativado por aquecimento a 100 ºC, durante 5 minutos. As concentrações de proteína utilizadas foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

Os géis utilizados tinham as dimensões 8 x 7,5 x 0,1 cm. O gel de empilhamento continha 5% de acrilamida e o tampão utilizado foi Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação, contendo 12,5% de acrilamida, foi preparado em Tris-HCl 3 M pH 8,8. A corrida

eletroforética foi realizada sob amperagem constante de 40 mA, voltagem inicial de 100 V, a 25 °C, usando-se como tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS. A corrida ocorreu em, aproximadamente, 3 horas.

Após a corrida eletroforética, as bandas proteicas puderam ser observadas por meio da coloração dos géis com solução de *Commasie Brilliant Blue* R-250 0,05% em água destilada, ácido acético e metanol, nas proporções 8:1:3,5 (v/v/v), por 4 horas, seguido da remoção do corante com a mesma solução desprovida de corante.

A fração HdLP e os picos cromatográficos I e II também foram avaliados por eletroforese em uma dimensão seguindo o protocolo descrito. Entretanto o gel foi corado com reagente de Schiff, utilizado para detecção de glicoproteínas. Lactotransferrina bovina (LTB) foi utilizada como controle positivo e a lectina Con A, como controle negativo.

5.6. Ensaios biológicos

5.6.1. Animais

Ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus* 230-280 g), ratos fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus* 140-180 g) e camundongos machos Swiss (*Mus musculus* 20-30 g) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em uma sala com condições de temperatura controlada (25 °C ± 2), onde tiveram livre acesso à água e comida. Grupos de 5 (ratos machos), 3 (ratos fêmeas) ou 10 (camundongos) animais foram aleatoriamente selecionados, seguindo a metodologia específica para cada teste experimental.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará (número de aprovação 43/2011), assim como de acordo com as regras internacionais de Experimentação Animal.

5.6.2. Avaliação da atividade antiinflamatória no látex íntegro (LJ), fração HdLP e picos cromatográficos de *H. drasticus*

O modelo clássico de peritonite induzida por carragenina em ratos foi utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória de LJ, assim como da fração proteica e dos picos cromatográficos.

Inicialmente foi realizado um experimento a fim de validar o uso popular do látex de *H. drasticus* (LJ) como um antiinflamatório. Para tal, foram utilizadas a mesma via de administração e doses similares às utilizadas na medicina popular. Segundo a pesquisa etnofarmacológica, as doses variam de 30 a 145 mL e são ingeridas uma ou duas vezes ao dia.

As doses de LJ foram escolhidas considerando a proporção de volume e peso corpóreo de um humano consumidor com relação ao peso corpóreo dos animais. Desta forma, a proporção de 30 mL (v.o) por 55 kg de peso corpóreo humano geraram as seguintes doses equivalentes para ratos: 0,27; 0,54 e 1,09 mL/Kg.

A fração HdLP foi avaliada por via oral utilizando as doses 1,0; 10,0 e 100 mg/kg e também por via endovenosa nas doses 0,1; 1,0; 10,0 e 100 mg/kg. As propriedades antiinflamatórias do pico cromatográfico II (5,0 mg/kg) obtidos após cromatografia de HdLP em matriz DEAE-Sepharose *fast flow* também foram investigadas, entretanto somente por via endovenosa. O pico cromatográfico I não foi testado devido ao baixo rendimento do material.

Grupos de ratos machos (n=5) receberam as doses de LJ, HdLP ou pico DEAE-II uma hora (via oral) ou trinta minutos (via endovenosa) antes do estímulo inflamatório, a carragenina (700 µg/cavidade; i.p.). Animais controle receberam somente salina estéril ou salina estéril e carragenina (i.p.). Nos ensaios onde a via de administração foi a oral, os animais ficaram em jejum por 4 horas antes do teste.

Após quatro horas do estímulo inflamatório, os animais foram anestesiados por meio de inalação com Halotano® e sacrificados por excesso de inalação deste anestésico. As cavidades peritoneais foram, então, lavadas por meio de injeção com 10 mL de salina estéril contendo 5 UI/mL de heparina. Após uma leve massagem nos abdomens, estes foram cortados e os fluidos peritoneais coletados por meio de pipeta Pasteur. Em seguida, as contagens total e diferencial de células foram mensuradas de acordo com o método descrito por Souza e Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido peritoneal de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk, seguindo-se a contagem total de leucócitos em microscopia ótica, utilizando câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de células, 50 µL do exsudato peritoneal de cada animal foram colocados em lâminas com suporte específico e centrifugados em citocentrífuga (500 x *g*, 10 minutos, 25 ºC). Após este processo as lâminas foram submetidas à coloração com kit panótico rápido para posterior análise diferencial de células em microscopia ótica.

5.6.3. Avaliação da persistência da atividade antiinflamatória na fração HdLP após desnaturação térmica e tratamento enzimático

A fim de avaliar se a estrutura tridimensional da proteína teria algum efeito sobre a atividade antiinflamatória de HdLP, dois tratamentos foram realizados: desnaturação térmica e tratamento enzimático utilizando pronase (uma mistura de proteases de *Streptomyces griseus* que atua clivando a proteína de forma inespecífica).

Para tanto, HdLP foi aquecida por 15, 30 e 60 minutos a 100 ºC. Paralelamente, HdLP foi clivada inespecificamente com pronase (1 mg/mL) por 24 horas. O sobrenadante e precipitado oriundos do aquecimento, assim como a fração pós-clivagem foram liofilizados para posterior ensaio de peritonite em ratos (HdLP 1,0 mg/kg; via endovenosa). A migração de células foi verificada como descrito anteriormente. Eletroforeses unidimensionais foram realizadas a fim de confirmar o efeito dos tratamentos.

5.6.4. Dosagem dos níveis de óxido nítrico no plasma de animais tratados com LJ e HdLP via oral

Dando continuidade ao procedimento experimental descrito acima, após anestesia e antes do sacrifício, amostras de sangue foram coletadas a partir do plexo retro-orbital dos animais. A coleta foi realizada em microtubos Eppendorf contendo EDTA, utilizando capilares heparinizados. Em seguida, as amostra de sangue foram centrifugadas (3.500 x *g*, 5 minutos, 4 °C) para a obtenção do plasma, no qual os níveis de oxido nítrico foram indiretamente determinados pelos níveis de nitrito (NO_2^-) (FENG *et al.*, 2001).

Para tanto, alíquotas de 100 µL do plasma dos animais foram incubadas com 100 µL do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H_3PO_4 1%/ 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidrocloreto/ H_3PO_4 1%/ água destilada, 1:1:1:1;v/v/v/v) em placas de Elisa, a 25 ºC (temperatura ambiente), por 10 minutos. Em seguida, a concentração de nitrito foi determinada pela leitura da densidade óptica das amostras a 540 nm e comparada com uma curva padrão realizada com $NaNO_2$.

5.6.5. Efeito de bloqueadores da síntese de óxido nítrico sobre a migração de neutrófilos em animais tratados com HdLP via oral

Para este experimento, dois inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOs) foram utilizados: N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-name; inibidor inespecífico da iNOs) e aminoguanidina (AG; inibidor seletivo da NOs induzida). Ambos os inibidores foram administrados na dose de 25 mg/kg (1 µg/ g de peso corpóreo), via endovenosa, 15 minutos antes da administração da amostra. HdLP (1,0 mg/kg) foi administrada em grupos de ratos (n=5) por via oral e após uma hora a peritonite foi induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina (700 µg/cavidade). Neste protocolo experimental houve mais de um grupo controle (n=5): controles positivo e negativo (somente salina estéril ou salina estéril e carragenina); controles dos inibidores (somente L-name ou AG e carragenina) e controle do efeito de HdLP (HdLP e carragenina).

Após quatro horas da injeção de carragenina, os animais foram anestesiados por meio de inalação com Halotano® e sacrificados por excesso de inalação deste anestésico. A contagem total e diferencial de células seguiu a metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985), já descrita anteriormente.

5.6.6. Dosagem de citocinas no plasma e fluido peritoneal de animais tratados com HdLP via oral

As concentrações de IL-1, IL-10 e TNF-α foram determinadas no plasma e fluido peritoneal de animais tratados com HdLP via oral, utilizando o método de imunoensaio ELISA (*Enzime-liked immunosorbent assay*). As amostras de soro e fluido dos grupos HdLP (1,0 mg/kg) e controles (somente salina estéril ou salina estéril e carragenina) foram obtidas no experimento descrito no subtópico anterior, tendo sido imediatamente estocadas a – 80 ºC para posterior dosagem das citocinas.

Placas de microtitulação de 96 poços foram incubadas com anticorpo por 12 h, a 4 ºC, com anti- IL-1, anti-IL-10 ou anti- TNF-α (4 µg/mL, 4 µg/mL ou 0,8 µg/mL, respectivamente; kit da R&D systems- Cat. Nº DY501, DY417 ou DY510, respectivamente). Após a sensibilização das placas, uma curva padrão com 12 pontos foi adicionada em várias diluições (concentrações iniciais de 1000 pg/mL para IL- 1, 2000 pg/mL para IL-10 e 2000 pg/mL para TNF-α) e as amostras foram adicionadas em duplicata, seguindo-se a incubação a

por 24 horas, a 4 ºC. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 0,05% (280 µL/poço) e incubadas com anticorpo monoclonal biotinilado anti- IL-1, anti- IL-10 ou anti- TNF-α diluídos (1:1000 com BSA/Tween-20 0,05%). Após 1 hora de incubação a 4 ºC, as placas foram novamente lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 0,05% e 50 µL do complexo HRP-avidina diluído (1:5000) foram adicionados. Decorridos 15 minutos de incubação, adicionou-se 50 µL do reagente colorimétrico dihidrocloreto-1,2-o-fenilenodiamina (OPD) e as placas foram incubadas por 20 minutos, a 25 ºC, na ausência de luz. A reação enzimática foi interrompida com 75 µL de H_2SO_4 1 M. A medida da absorbância foi mensurada a 490 nm e as concentrações de citocinas foram calculadas por comparação com os valores da curva padrão. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL.

5.6.7. Histologia e análise morfológica de baço, fígado e rins de animais tratados com HdLP via oral

Os órgãos baço, fígado e rins foram retirados dos animais e fixados em formol 10% pH 7,6. Em seguida foram desidratados em álcool 70% para posterior imersão em parafina. Secções de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e examinadas por microscopia de luz (100x e 400x de aumento visual). A presença de alterações morfológicas, lesões e/ou citotoxicidades foi alvo de investigações.

5.6.8. Avaliação de efeitos de toxicidade aguda após ingestão de látex íntegro (LJ) e fração protéica (HdLP) de *Himatanthus drasticus*

Para avaliar a toxicidade aguda das amostras (v.o.), seguiu-se o protocolo experimental número 423 da OECD (2001). Para tanto, ratos fêmeas (140-180 g) foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, contendo 3 animais cada. Cada animal foi colocado individualmente em uma caixa sem maravalha e ficaram em jejum de água, mas não de comida, por 8 horas antes do início do teste. As doses testadas de HdLP foram 300, 2000 e 5000 mg/kg e para LJ uma dose única de 5,4 mL/kg (dez vezes maior que a dose testada nos demais experimentos via oral). O grupo controle recebeu apenas água. As observações comportamentais sistemáticas foram avaliadas 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 24 horas após a

administração das amostras e diariamente até o décimo quarto dia. O *screening* hipocrático englobou observações da atividade geral/ sistema sensorial, sistema psicomotor, sistema nervoso central e autônomo. Estas foram mensuradas em escores (0-4), segundo descrito por Brito (1994) (ver descrições no anexo I). Os seguintes parâmetros foram avaliados: Atividade geral, frênito vocal, irritabilidade, reflexo corneal, reflexo auricular, resposta ao aperto de cauda, resposta ao toque, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força para agarrar, ataxia, tremores, convulsões, enrijecimento da calda (*straub tail*), hipnose, anestesia, ptose, lacrimação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose. As quantidades de ração e água consumidas e peso das fezes foram mensurados diariamente. O peso corpóreo foi avaliado no primeiro dia, antes da administração das amostras, e por mais cinco vezes no decorrer dos 14 dias.

Após 14 dias de avaliação, os animais foram sacrificados pela inalação excessiva de Halotano®. Os órgãos fígado, baço e rins foram retirados, pesados para verificação do peso relativo (peso do órgão/100 g do peso corpóreo) e analisados macroscopicamente quanto a quaisquer lesões ou necroses existentes.

5.6.9. Investigação de atividade pró-inflamatória na fração HdLP

Para investigar uma possível resposta inflamatória causada pela fração HdLP o modelo de peritonite em ratos foi utilizado. Neste ensaio, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi comparada entre os grupos de ratos tratados (n=5), via intraperitoneal, com HdLP (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL/cavidade) com os ratos controle (n=5) que receberam salina estéril (1 mL/ cavidade). Não houve grupo de ratos recebendo carragenina, visto que o objetivo foi verificar se a amostra possui o efeito desempenhado por este reagente.

Após quatro horas da administração da amostra, os animais foram anestesiados por meio de inalação com Halotano® e sacrificados por excesso de inalação deste anestésico. As cavidades peritoneais foram lavadas com 10 mL de salina estéril contendo 5 UI/mL de heparina. Os fluidos peritoneais foram recuperados, seguindo-se a contagem total e diferencial de células, mensuradas de acordo com Souza e Ferreira (1985).

A persistência da atividade pró-inflamatória também foi investigada após esse ensaio biológico. Para tanto, o mesmo procedimento experimental foi realizado, porém apenas a dose que se mostrou pró-inflamatória, uma inferior e outra superior a esta foram testadas (2,5; 5,0 e 10,0 mg/mL/cavidade). Os animais ficaram sob observação por sete dias após a injeção da

amostra ou salina, seguindo-se a anestesia e sacrifício por excesso de inalação com Halotano®. A partir deste ponto, o mesmo protocolo descrito acima foi executado.

5.6.10. Avaliação de efeito antinociceptivo em animais tratados com HdLP

Dois modelos clássicos de nocicepção foram utilizados a fim de investigar a atividade antinociceptiva na fração HdLP: modelo de contorção induzida por ácido acético e teste da formalina.

5.6.10.1. Modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético

Grupos de camundongos machos (n=10) foram injetados com ácido acético 0,6% (10 µL/g peso corpóreo), via intraperitoneal. Após 10 minutos da injeção, iniciou-se a contagem de contorções abdominais, a qual se prolongou por 20 minutos (Koster *et al*., 1959). HdLP (0,1; 1,0 e 10 mg/kg) em 0,1 mL de salina estéril foi administrada nos animais, via endovenosa, 30 minutos antes da injeção com ácido acético. Animais controle (n=10) receberam salina estéril (0,1 mL/10 g de peso corpóreo) e morfina (5 mg/kg; via subcutânea) foi usada como droga de referência.

5.6.10.2. Teste da formalina

Neste ensaio, camundongos (n=10) receberam a injeção de 20 µL de formalina 1% no espaço subcutâneo da pata traseira direita. A resposta nociceptiva foi mensurada de acordo com o método descrito por Fasmer e colaboradores (1985). O tempo em que o animal passa lambendo a pata após a injeção intraplantar é cronometrado nos 5 primeiros minutos (fase neurogênica) e nos minutos 20-25 (fase inflamatória). HdLP (0,1; 1,0 e 10 mg/kg) em 0,1 mL de salina estéril foi administrada nos animais, via endovenosa, 30 minutos antes da injeção com formalina. Animais controle (n=10) receberam salina estéril (0,1 mL/10 g de peso corpóreo) e morfina (5 mg/kg; via subcutânea) foi usada como droga de referência.

5.6.11. Investigação de déficits neurológicos e anormalidades na coordenação motora de animais tratados com a fração HdLP

Após os testes de nocicepção, alguns experimentos foram realizados a fim de comprovar que os resultados obtidos nestes ensaios não foram falso-positivos, ou seja, causados por substâncias outras que induzem problemas neurológicos ou musculares. Desta forma, os testes de *Rota-rod* (avaliação de déficits neurológicos) e Campo aberto ou *Open-Field* (avaliação de anormalidades na coordenação motora) foram escolhidos para a análise destes parâmetros.

5.6.11.1. Teste Rota-rod

Neste ensaio grupos de camundongos (n=8) foram testados quanto à habilidade em permanecer sobre uma barra (diâmetro 2,5 cm) dividida em 6 compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro, sob constante velocidade de rotação (14 revoluções/ minuto) (NOVAS *et al*., 1988). Para tanto, os animais foram previamente selecionados 24 horas antes do teste, a fim de selecionar somente os capazes de permanecer sobre a barra por dois períodos consecutivos de 60 segundos. HdLP (1,0 ou 10,0 mg/kg) foi administrada, via endovenosa, 30 minutos antes do teste. Animais controle (n=8) receberam 0,1 mL de salina estéril pela mesma via de administração e diazepan (5 mg/kg; via intraperitoneal) foi usado como droga de referência.

5.6.11.2. Teste do campo aberto

Grupos de camundongos (n=8) foram separadamente colocados em um "campo aberto", uma caixa com fundo preto separado em 9 quadrados e paredes de acrílico transparente (30 x 30 x 15 cm). Nesta arena, o animal pode caminhar livremente por 1 minuto. Em seguida, foi mensurado por 5 minutos o número de unidades de quadrados delimitados que o animal tocou simultaneamente com as quatro patas, parâmetro este que foi denominado frequência de locomoção (PU *et al*., 1995). Animais foram tratados via endovenosa com HdLP (1,0 ou 10,0 mg/kg), salina estéril (0,1 mL) ou diazepan (5 mg/kg), 30 minutos antes do teste.

5.6.12. Análise estatística

Os resultados dos testes biológicos foram expressos como média ± E.P.M. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida pelos teste de Bonferroni (ensaios de inflamação), testes de Student-Neuman-Keuls ou Bonferroni (ensaios de nocicepção) ou teste de Tukey (ensaio de toxicidade). Para estas análises utilizou-se o programa estatístico *GraphPad Prism Software* versão 5.0 (San Diego, CA). Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Alguns dados dos experimentos de toxicidade aguda foram analisados de forma mais simplificada utilizando as ferramentas do *Microsoft Office Excel* versão 2007.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica parcial da fração HdLP já havia sido realizada por Matos (2010). Portanto, neste trabalho apenas alguns procedimentos de caracterização foram realizados. Cromatografias de troca iônica em DEAE-Sepharose *fast flow* foram refeitas a fim de se obter maiores quantidades de picos cromatográficos. Contudo, apenas o PII apresentou uma massa suficiente para a realização dos ensaios biológicos. Na detecção qualitativa de fitoquímicos deu-se especial atenção para a possível detecção do triterpeno lupeol nesta fração. A cromatografia em camada delgada realizada com este propósito confirmou que HdLP está isenta deste composto em sua composição (Figura 5). A partir deste resultado, os ensaios biológicos foram realizados com a certeza de que qualquer atividade encontrada nesta fração não estaria relacionada com esse triterpeno.

A ausência de triterpenos foi confirmada pelo método qualitativo de dosagem de fitoquímicos, todavia outros metabólitos secundários foram identificados (Tabela 1).

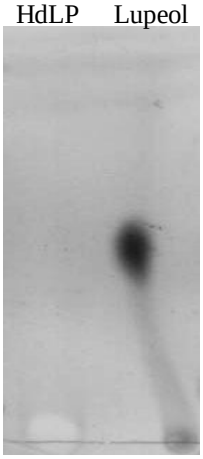

Figura 5 – Avaliação da presença do triterpeno lupeol (R_f 0,75) na fração proteica de *H. drasticus*. HdLP (1,0 mg) foi dissolvido em diclorometano e 20 µL desta solução foram aplicados em placa de sílica. A cromatografia em camada delgada foi realizada em um gradiente ascendente de vanilina (P.A.) seguida por aquecimento a 50 °C.

Tabela 1 – Perfil qualitativo de fitoquímicos na fração HdLP de *Himatanthus drasticus*.

Composto	Detectado em HdLP	Descrito em alguma planta laticífera	Massa molecular (Da)
Saponinas	Sim	Sim: látex (HOFFMANN *et al*., 2007); folhas (WONG *et al*., 2011)	600 - 2000
Esteróides livres	Sim	Sim: folhas (LHINHATRAKOOL e SUTTHIVAIYAKIT, 2006); látex (LIENGPRAYOON *et al*., 2011)	200 – 400
Triterpenóides	Não	Sim: látex (LUCETTI *et al*., 2010); folhas (WONG *et al*., 2011)	420 – 430
Taninos (catequéticos)	Sim	Sim: frutos (ATANASSOVA e BAGDASSARIAN, 2009); folhas (WONG *et al*., 2011)	500-3000
Fenóis	Não	Sim: látex (SNOOK, 1994)	Em torno de 96
Flavonóides (antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis) e Xantonas	Não	Sim: casca (IGBINOSA *et al*., 2011)	270-320

A eletroforese para detecção de glicoproteínas também mostrou que tanto HdLP quanto seus picos cromatográficos possuem essas moléculas (Figura 6). Isto confirma o resultado da quantificação de polissacarídeos (DUBOIS *et al*., 1956), onde foram quantificadas aproximadamente 45% de carboidratos na amostra.

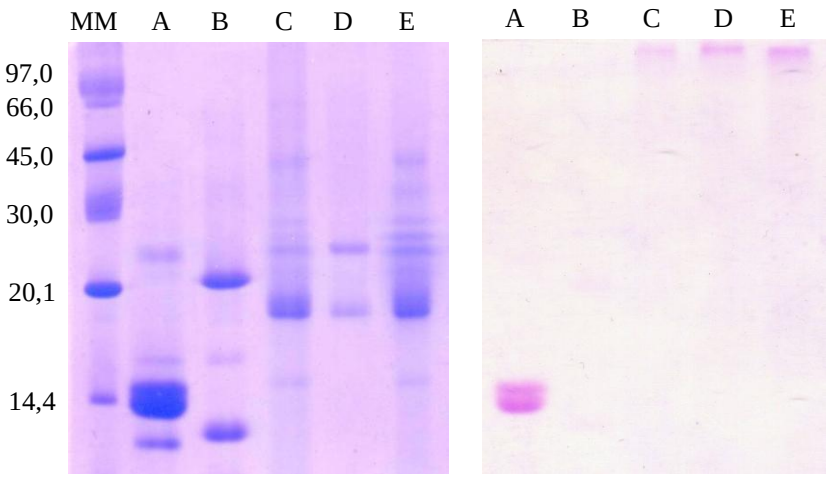

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS (painel esquerdo) e seu correspondente revelado com reagente de Schiff (painel direito). Linha MM- marcador molecular; Linha A - Ribonuclease B, uma glicoproteína padrão (controle positivo); Linha B – Concanavalina A, lectina de *Canavalia ensiformes* (controle negativo); Linha C – fração HdLP; Linha D - PI DEAE- Sepharose; Linha E – PII DEAE- Sepharose.

6.2. Ensaios biológicos

Inicialmente, um ensaio foi realizado como o látex íntegro de *H. drasticus* (LJ), simulando as mesmas condições recomendadas na medicina popular (mesma via de administração e doses/kg similares). Para tal, LJ foi oralmente administrado em ratos e, após 4 horas, receberam carragenina como estímulo inflamatório (via i.p.). O resultado mostrou que o LJ foi capaz de inibir significativamente a migração de neutrófilos para o foco da irritação de uma forma dose-dependente (Figura 7), atingindo 98% de inibição quando na máxima dose.

Considerando a existência de uma fração majoritariamente proteica em *H. drasticus*, foi investigado o envolvimento desta fração HdLP na promoção do efeito antiiflamatório. O resultado obtido mostrou que, ao menos em parte, as proteínas de *H. drasticus* estão associadas com a atividade antiinflamatória, pois o influxo de neutrófilos induzido por carragenina também foi reduzido quando HdLP foi administrada em ratos por via oral. Todavia, não foi observada um dose-dependência, visto que apenas a menor dose de 1,0 mg/kg foi efetiva (Figura 8a). Quando administrado por via endovenosa, entretanto, HdLP exibiu um potente e dose-dependente efeito antiinflamatório (Figura 8b).

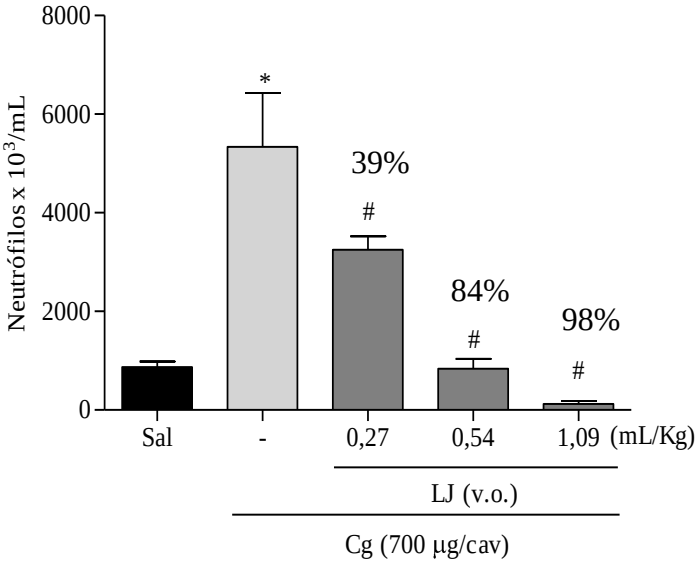

Figura 7 – Efeito antiinflamatório de LJ na migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos. Os animais foram tratados oralmente com salina estéril NaCl 0,15 M (Sal) ou látex de Janaguba (LJ). Carragenina (Cg) foi administrada, via intraperitoneal, uma hora após a administração da amostra. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após o estímulo inflamatório. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal e # $p < 0,05$ comparado ao grupo Cg (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

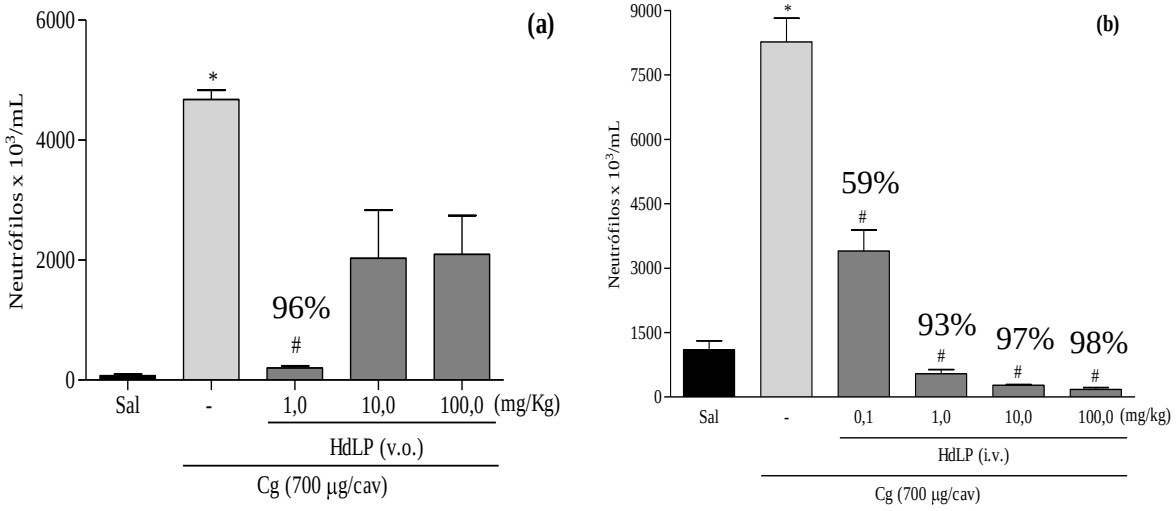

Figura 8 – Efeito de HdLP sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos utilizando as vias oral (a) e endovenosa (b). Os animais foram tratados com salina estéril NaCl 0,15 M (Sal) ou HdLP. Carragenina (Cg) foi injetada intraperitonealmente 1 h (a) ou 30 minutos (b) após a administração da amostra. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após o estímulo inflamatório. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal e # $p < 0,05$ comparado ao grupo Cg (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Durante os experimentos onde a via oral foi a via de administração utilizada, alíquotas de sangue foram retiradas dos animais para dosagem de óxido nítrico no plasma. HdLP teve apenas a sua dose efetiva (1,0 mg/kg) associada ao aumento dos níveis de NO no plasma sanguíneo (Figura 9a). LJ, por sua vez, também promoveu aumento dos níveis de NO, contudo isto ocorreu apenas na dose intermediária (Figura 9b).

A partir deste resultado de HdLP um novo experimento foi realizado, desta vez utilizando um inibidor inespecífico (L-name) e um seletivo (AG) da enzima óxido nítrico sintase induzida. A figura 10 mostra que a atividade antiinflamatória de HdLP se correlaciona com o aumento da produção de óxido nítrico. Quando os animais receberam apenas HdLP (via oral), a migração de neutrófilos foi inibida, o que confirma o resultado anteriormente descrito. Entretanto, quando L-name ou AG (via endovenosa) foram administrados previamente à administração de HdLP (v.o), a migração de neutrófilos foi claramente não

revertida. Os grupos controle dos inibidores confirmam a ação destes compostos quanto à síntese do óxido nítrico.

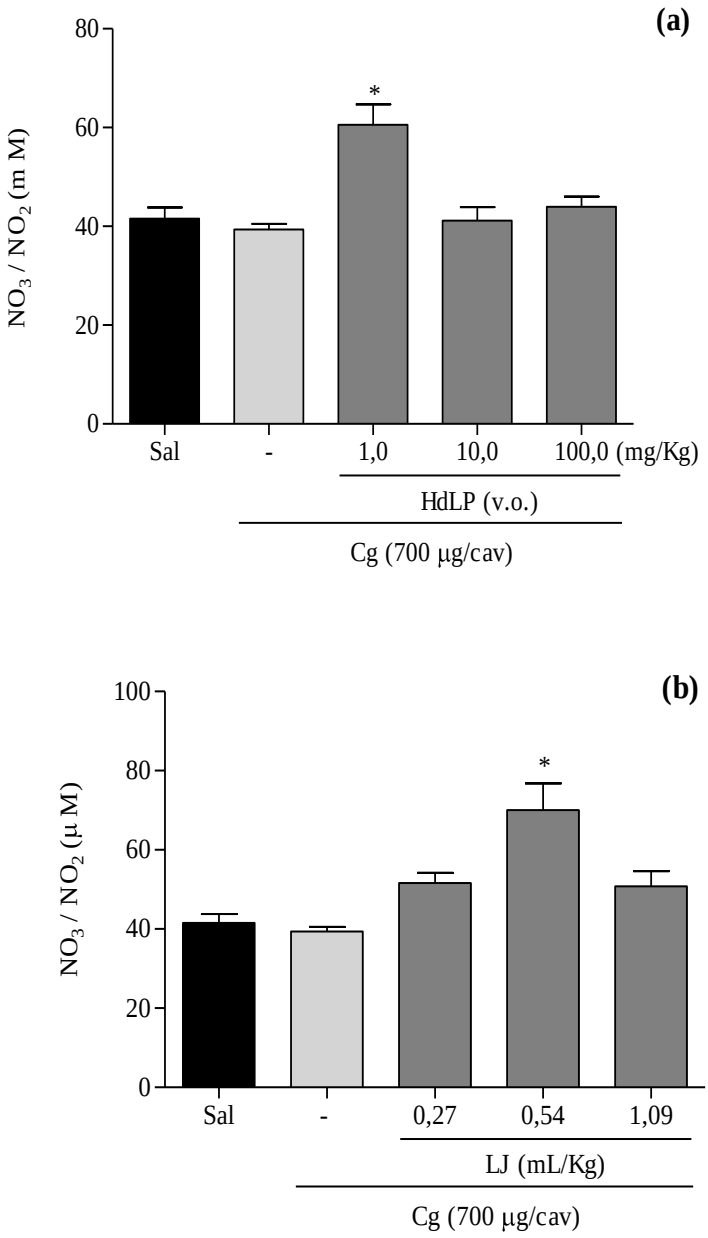

Figura 9 – Aumento nos níveis de óxido promovidos por HdLP (a) e LJ (b) no plasma sanguíneo de animais tratados via oral. Animais receberam salina estéril NaCl 0,15 M (Sal), HdLP ou LJ. Carragenina (Cg) foi injetada intraperitonealmente uma após a administração das amostras. Os níveis de óxido nítrico (NO_3/NO_2) no plasma sanguíneo foram mensurados 4 h após o estímulo inflamatório. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p <$ 0,05 comparado ao grupo Sal (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

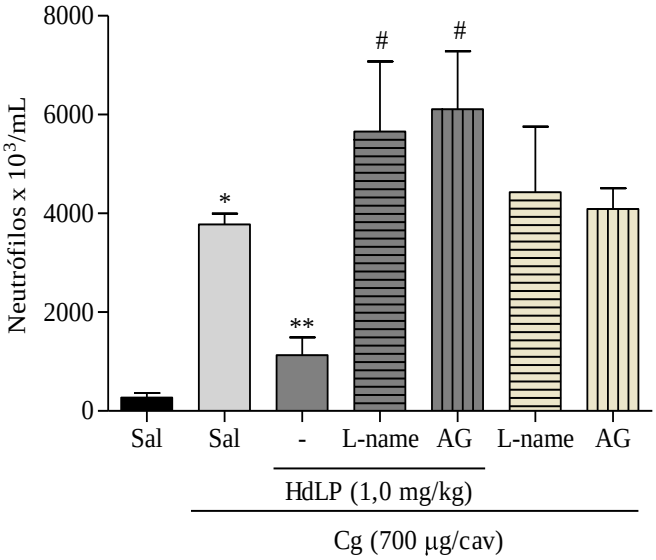

Figura 10 – Efeito dos inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida (L-NAME e AG) sobre a atividade antiinflamatória das proteínas do látex de *H. drasticus*. HdLP (1,0 mg/kg, v.o.) foi administrada nos animais 15 minutos após a injeção de L-NAME ou AG (25 mg/kg, i.v.). Peritonite foi induzida uma hora após a administração da amostra por meio da injeção intraperitoneal de carragenina (700 ug/cavidade) em ratos. Decorridas 4h, a contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal foi realizada. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal + carragenina e # $p < 0,05$ comparado ao grupo HdLP (-) (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Os animais dos grupos salina, salina + carragenina e grupo HdLP (1,0 mg/kg), derivados do ensaio anteriormente descrito, também foram alvo de investigação quanto a presença das citocinas IL-1, TNF-α e IL-10 no plasma sanguíneo e fluido peritoneal; além de análise histopatológica de fígado, rins e baço.

O método utilizado para a dosagem de citocinas mostrou que o agente inflamatório carragenina (i.p.) induziu um aumento significativo nas concentrações das citocinas IL-1 e TNF-α apenas no fluido peritoneal dos animais, quando comparado ao grupo salina. O pré-tratamento dos animais (v.o) com HdLP foi capaz de reverter este quadro significativamente

(Figura 11 a e b). A citocina IL-10 não foi detectada em níveis significativos em nenhum dos grupos testados.

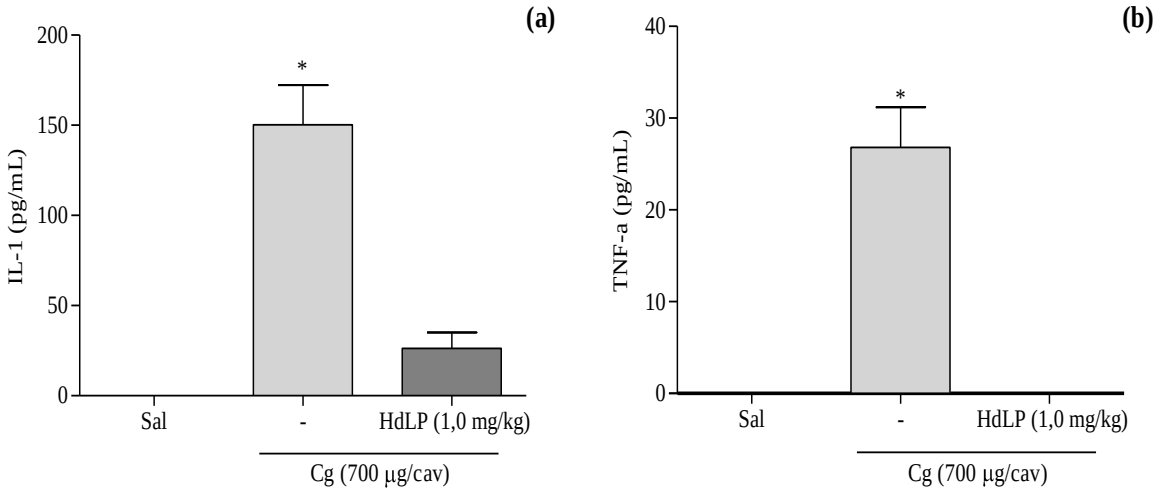

Figura 11 – Fração HdLP altera os níveis de IL-1 (a) e TNF-α (b) no fluido peritoneal de ratos no modelo de peritonite induzido por carragenina. Os animais foram tratados com HdLP (1,0 mg/kg) ou salina estéril NaCl 0,15 M (Sal) uma hora antes do estímulo inflamatório (700 ug/cavidade). A dosagem das citocinas foi realizada no fluido peritoneal recuperado após 4 h da injeção da carragenina. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Na análise histopatológica foram observados efeitos tóxicos no fígado dos animais que receberam carragenina. Estes apresentaram vacuolização e hiperplasia das células de Kupfer (Figura 12b), em comparação com os animais do grupo salina (Figura 12a). Estas modificações foram prevenidas pelo tratamento com HdLP (Figura 12c). Apesar destas alterações no fígado, nenhuma modificação significativa foi detectada nos rins e baço entre os animais tratados com HdLP e os grupos controles (dados não mostrados).

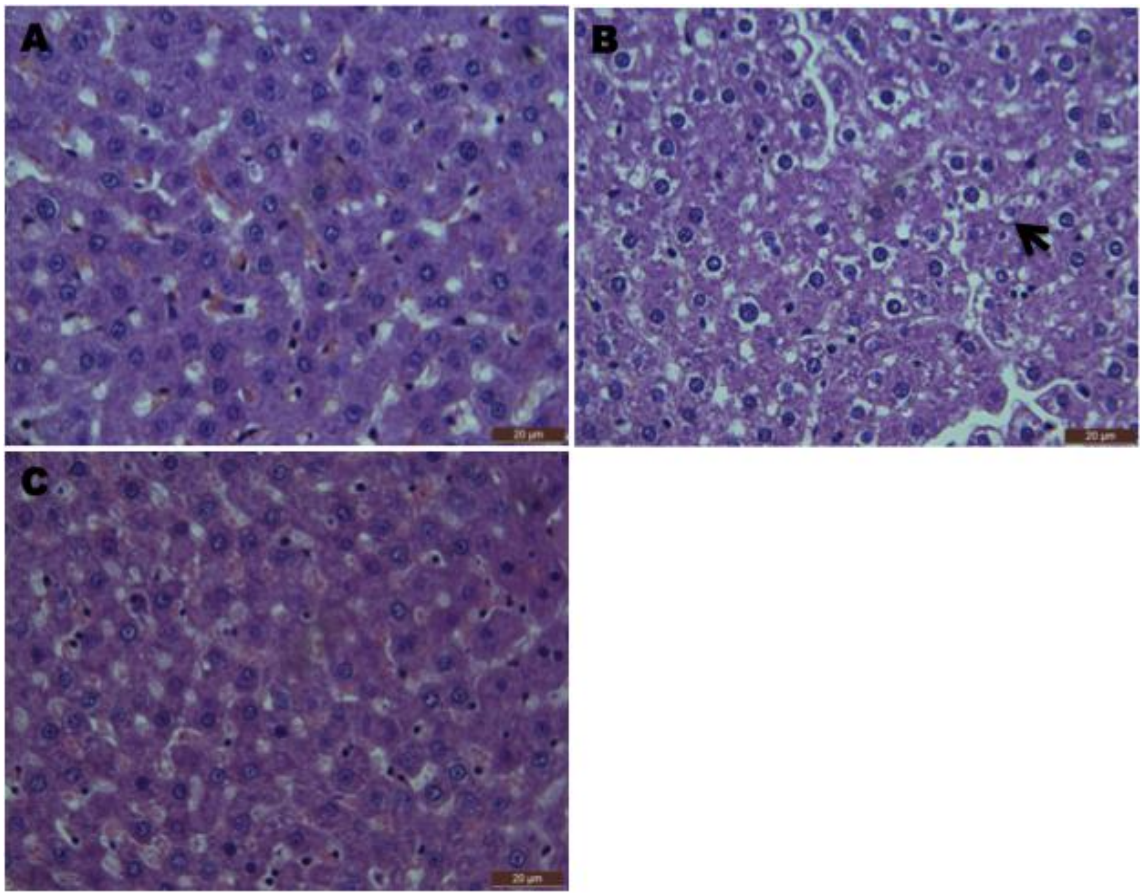

Figura 12 - Tratamento com HdLP previne efeitos tóxicos decorrentes da administração de carragenina. As fotomicrografias mostram a histopatologia do fígado de animais que receberam salina (a), carragenina 700 ug/cavidade (b) ou HdLP 1,0 mg/kg (c), analisadas por microscopia de luz (Aumento visual de 400x). A seta indica a degeneração das células de Kupfer.

Após todos estes experimentos onde a administração de HdLP foi realizada por via oral e tendo obtido o resultado de que esta fração também é efetiva pela via endovenosa, decidiu-se prosseguir os demais experimentos biológicos utilizando esta via de administração.

Desta forma, dando continuidade aos ensaios de inflamação, a fração HdLP também foi submetida aos tratamentos de desnaturação por aquecimento (100 ºC) por 15, 30 e 60 minutos e tratamento enzimático com a enzima pronase. O intuito de ambos os tratamentos foi verificar a persistência da atividade após mudanças na estrutura terciária das proteínas. A tabela 2 apresenta os valores da migração de neutrófilos após os dois tratamentos, bem como o potencial antiinflamatório, expresso em porcentagem de inibição da migração. Os valores da

inibição foram calculados por comparação com os grupos controle carragenina, os quais foram: 5015,25 neutrófilos x 10^3/ mL (desnaturação por aquecimento) e 6990,0 neutrófilos x 10^3/ mL (clivagem com pronase); a diferença estatística entre os grupos foi dada por $p < 0,05$, comparado ao grupo Sal (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Os resultados obtidos indicam que a atividade antiinflamatória desempenhada por HdLP é promovida por proteínas. HdLP perdeu seu efeito antiinflamatório após 30 minutos de aquecimento a 100 ºC, mas esta atividade não foi afetada pelo tratamento enzimático. Todavia, a eletroforese unidimensional realizada com a fração pós clivagem mostra que as proteínas não foram completamente clivadas no tratamento com pronase (Figura 13).

Tabela 2 – Efeito da desnaturação por aquecimento e clivagem enzimática sobre a atividade antiinflamatória de HdLP (1,0 mg/kg).

Grupo	**Neutrófilos x 10^3/mL (Controles)**	**Neutrófilos x 10^3/mL**	**Inibição da migração (%)**
HdLP nativa, a 25 ºC	5015,25 */ 6990,0 **	1233,8	75,4% * / 82,3% **
Após 15 minutos, a 100 ºC	5015,25	1801,4	64%
Após 30 minutos, a 100 ºC	5015,25	1805.6	64%
Após 60 minutos, a 100 ºC	5015,25	2914,33	Sem inibição
Tratado com pronase	6990,0	798,4	89%

* - Referente ao experimento de desnaturação por aquecimento; ** - Referente ao ensaio de digestão proteolítica com pronase.

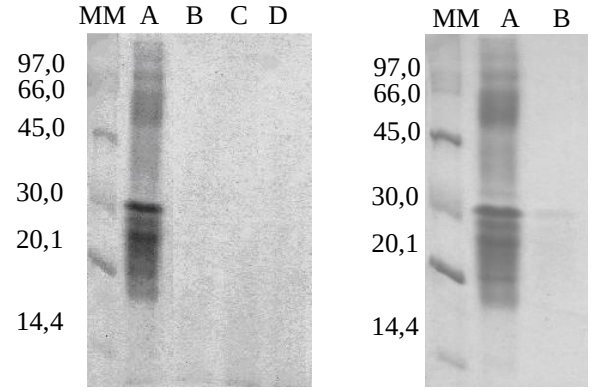

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β-Mercaptoetanol. Painel esquerdo: Linha MM- marcador molecular, Linha A – HdLP, Linhas B, C, D – HdLP após aquecimento (100 ºC) por 15, 30 e 60 minutos, respectivamente; Painel direito: Linha A – HdLP, Linha B – HdLP após tratamento com pronase.

Considerando o potencial antiinflamatório exibido por HdLP, o pico cromatográfico II (PII), oriundo da cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sepharose *fast flow* (MATOS, 2010) também foi investigado quanto à presença desta atividade. Como dito anteriormente, o pico I não foi testado devido ao baixo rendimento da amostra. O resultado obtido indicou que P II (5,0 mg/kg) conseguiu inibir a migração de células para a cavidade peritoneal em 56% (Figura 14).

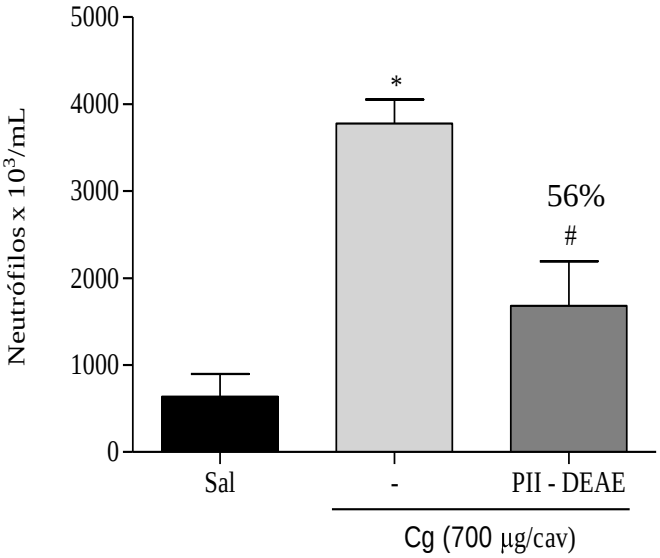

Figura 14 – Atividade antiinflamatória do pico cromatográfico II – DEAE- Sepharose *fast flow* oriundo de HdLP, por via endovenosa. Animais foram tratados com salina estéril NaCl 0,15 M (Sal) ou PII (5 mg/kg). Carragenina (Cg) foi injetada intraperitonealmente 30 minutos

após a administração da amostra. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após o estímulo inflamatório. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal e # $p < 0,05$ comparado ao grupo Cg (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

A fração HdLP foi também desafiada a apresentar atividade pró-inflamatória utilizando o modelo de peritonite em ratos. Os resultados mostraram que o efeito pró-inflamatório de HdLP inicia-se na dose de 5,0 mg/kg e quanto menor a dose anterior a esse valor, menor é a probabilidade de se encontrar este efeito (Figura 15a). A inflamação mostrou-se persistente mesmo após decorridos 7 dias da administração da amostra, contudo a migração de células, quando comparada ao primeiro experimento, foi reduzida em aproximadamente 5 vezes (Figura 15b).

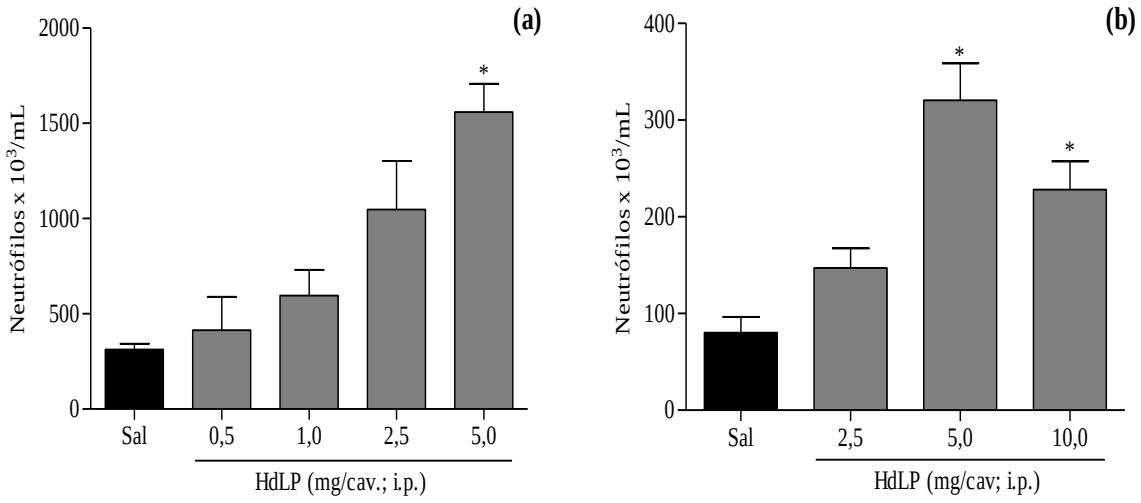

Figura 15 – Efeito pró-inflamatório da fração HdLP sobre a migração de neutrófilos em ratos. A fração foi injetada nas cavidades peritoneais (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 mg/cavidade) e a migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a administração da amostra ou salina estéril NaCl 0,15 M (Sal) (a). HdLP foi igualmente administrada via i.p. (2,5; 5,0; 10,0 mg/cavidade) e, após 7 dias da administração da amostra ou salina estéril NaCl 0,15 M, a migração de neutrófilos foi avaliada (b). Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n = 5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sal (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Partindo para outro efeito farmacológico, a fração HdLP foi investigada quanto à presença de atividade antinociceptiva. A via de administração estudada foi a via endovenosa. No ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, HdLP conseguiu inibir as contorções em até 60%, quando na maior dose testada (Tabela 3), todavia não foi mais efetiva que a morfina (controle positivo). Também se pode observar que a menor dose efetiva testada foi exatamente a mesma dose efetiva determinada no ensaio de antiinflamação.

Tabela 3 – Atividade antinociceptiva de HdLP na resposta à contorção induzida por ácido acético.

Grupos experimentais	**Número de contorções abdominais (20 min)**	**Inibição (%)**
Controle	22,2 ± 3,9	-
Morfina (5 mg/Kg; s.c.)	2,2 ± 0,5*	90
HdLP 0,1 (mg/Kg; i.v.)	18,6 ± 4,2	16
HdLP 1,0 (mg/Kg i.v.)	11,4 ± 1,9*	49
HdLP 10,0 (mg/Kg; i.v.)	8,9 ± 2,2*	60

Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n=10; $p < 0,05$; ANOVA – teste de Student-Neuman-Keuls). * indica que os resultados são estatisticamente diferentes do controle salina. Todas as amostras foram administradas 30 minutos antes da estimulação por ácido acético 0,6%.

Seguindo a mesma linha de ensaios, a tabela 4 mostra que HdLP reduziu significativamente o tempo de lambedura da pata de camundongos no teste da formalina. Na fase neurogênica HdLP atingiu 43% de inibição na dose máxima testada, contudo, foi mais eficaz durante a fase inflamatória (88% de inibição), conseguindo um resultado similar ao controle positivo morfina.

Tabela 4 – Efeito inibitório de HdLP sobre a lambedura de pata induzida pela injeção subplantar de formalina.

Tratamento	**Lambedura da pata (s)**			
	Fase neurogênica		**Fase inflamatória**	
	1º fase	**Inibição (%)**	**2º fase**	**Inibição (%)**
Controle	53,2 ± 4,8	-	31,3 ± 2,8	-
Morfina (5 mg/Kg; s.c.)	15,2 ± 0,6*	71	4,6 ± 0,7*	85
HdLP 0,1 (mg/Kg; i.v.)	49,5 ± 7,4	7	29,4 ± 4,1	6
HdLP 1,0 (mg/Kg; i.v.)	32,1 ± 5,2*	40	12,0 ± 4,0*	62
HdLP 10,0 (mg/Kg; i.v.)	30,1 ± 6,9*	43	3,9 ± 1,9*	88

Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n=10; $p < 0,05$; ANOVA – teste de Student-Neuman-Keuls). * indica que os resultados são estatisticamente diferentes do controle salina. Todas as amostras foram administradas 30 minutos antes da estimulação por formalina 1%.

Os resultados dos ensaios que investigaram se HdLP causava alguma anormalidade neurológica ou motora corroboraram com os resultados de antinocicepção acima citados. No teste rota-rod, o tempo de permanência na barra dos animais tratados com HdLP foi estatisticamente semelhante ao controle salina (Figura 16a). Da mesma maneira, no ensaio de campo aberto os animais não tiveram a locomoção afetada após o tratamento com HdLP, visto que tocaram um número estatisticamente similar de campos delimitados quando comparados ao controle salina (Figura 16b).

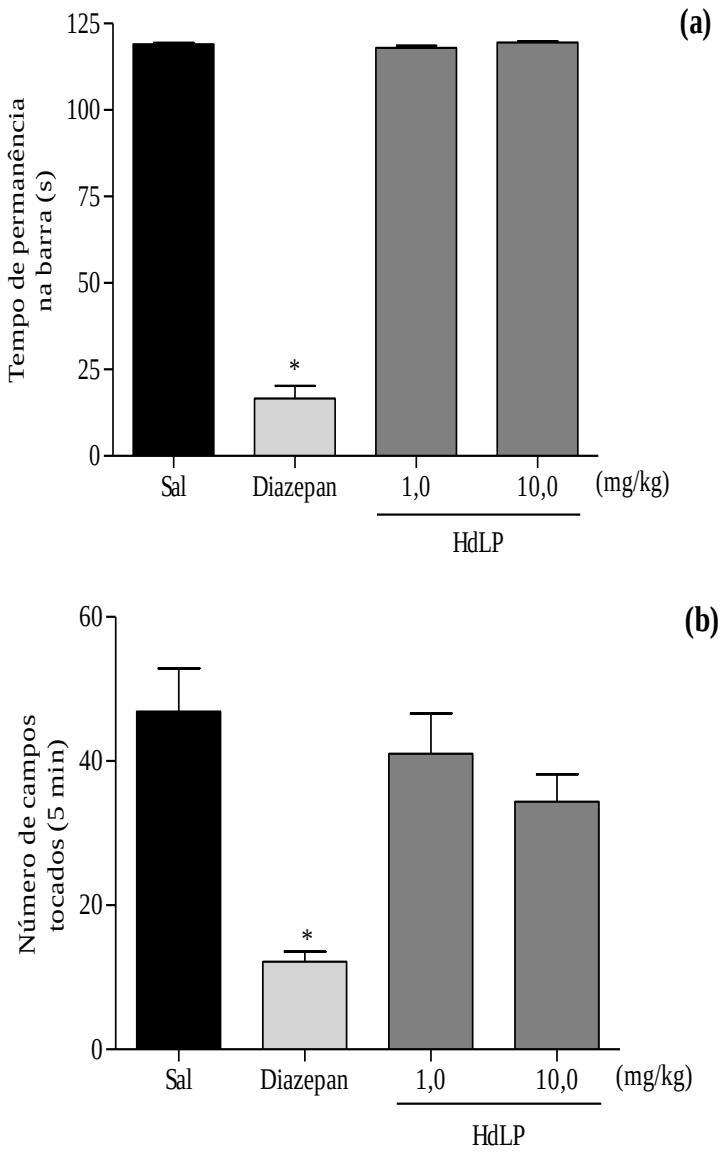

Figura 16 – Efeito da fração HdLP sobre a coordenação neurológica (a) e locomotora (b) de camundongos. Animais foram tratados com salina (controle; i.v.), diazepan (5 mg/kg; i.p.) ou HdLP (1,0 ou 10 mg/kg; i.v.) 30 minutos antes de serem colocados na barra ou campo aberto, respectivamente. Valores estão expressos como média ± E.P.M. (n=8; $p < 0,05$; ANOVA – teste de Bonferroni).

Considerando as atividades farmacológicas desempenhadas por LJ e HdLP, tornou-se necessária uma verificação de sinais de toxicidade aguda oriundos da ingestão destas substâncias. Para tanto, foram utilizadas doses 10 vezes maiores que a recomendada para LJ e 300, 2000 e 5000 vezes maiores que a dose efetiva de 1,0 mg/kg para HdLP.

Após 14 dias de avaliação, nenhuma das doses testadas (v.o.) causou a morte dos animais. Além disso, os parâmetros de peso corpóreo, consumo de água e de ração, produção de excretas e urina dos grupos experimentais não foram considerados estatisticamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$) durante todo o período de avaliação (Tabela 5 e 6). Quanto ao *screening* hipocrático, existiram algumas diferenças pontuais e distribuídas entre os grupos durante os 14 dias. Alguns animais dos diversos grupos apresentaram irritabilidade e outros tiveram uma resposta tardia ou latente ao toque em alguns dias, às vezes com gemidos nas primeiras horas de avaliação (*screening* de atividade geral e sensorial). Quanto ao *screening* do sistema nervoso autônomo, os animais do grupo HdLP 5000 mg/kg apresentaram diarréia nas primeiras horas após a administração da amostra (este efeito desapareceu após 24 horas), além de leve piloereção no decorrer dos dias; hipotermia leve foi uma característica de quase todos os animais, inclusive do grupo controle. Nenhuma alteração foi detectada nas avaliações psicomotoras ou do sistema nervoso central. A análise estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$) não considerou diferenças significativas entre os grupos experimentais e o controle.

Os órgãos também não apresentaram nenhuma alteração macroscópica e os pesos relativos não tiveram diferença estatística significativa entre os animais submetidos a tratamento com LJ e HdLP e o grupo controle (Tabela 7).

Tabela 5 – Avaliação dos parâmetros fisiológicos de peso corpóreo e consumo de água e ração de animais oralmente tratados com látex de Janaguba ou HdLP em ensaio de toxicidade aguda.

Grupos (n=3)		**Peso córporeo (g)**	**Consumo de água (mL)**	**Consumo de ração (g)**
Controle	Inicial	156,3 ± 4,096	45,00 ± 0,5774	9,667 ± 4,485
	Final	190,0 ± 5,508	23,67 ± 0,6667	13,33 ± 0,6667
LJ (5,4 mL/kg)	Inicial	143,0 ± 2,517	63,33 ± 6,936	17,33 ± 1,453
	Final	173,3 ± 4,910	25,67 ± 3,480	12,33 ± 0,333
HdLP (300 mg/kg)	Inicial	162,0 ± 7,506	40,00 ± 6,000	15,00 ± 2,082
	Final	192,3 ± 11,89	22,00 ± 2,082	14,33 ± 1,453
HdLP (2000 mg/kg)	Inicial	158,0 ± 3,786	43,67 ± 5,548	13,33 ± 1,856
	Final	191,0 ± 2,646	23,00 ± 0,577	13,67 ± 0,882
HdLP (5000 mg/kg)	Inicial	168,7 ± 4,333	38,33 ± 6,173	10,67 ± 3,844
	Final	199,0 ± 4,933	26,33 ± 4,177	12,67 ± 0,667

Valores estão expressos como média ± E.P.M. ($p < 0,05$ – ANOVA - Teste de Tukey).

Tabela 6 – Avaliação dos parâmetros fisiológicos de produção de excretas de animais oralmente tratados com látex de Janaguba ou HdLP em ensaio de toxicidade aguda.

Grupos (n=3)		**Produção de excretas (nº de pellets)**	**Produção de excretas (g)**	**Produção de urina (nº de poços úmidos)**
Controle	Inicial	34,67 ± 5,239	8,000 ± 0,577	6,333 ± 0,667
	Final	35,00 ± 2,646	7,667 ± 0,333	12,33 ± 0,882
LJ (5,4 mL/kg)	Inicial	38,33 ± 2,333	10,00 ± 1,155	5,000 ± 0,577
	Final	21,33 ± 3,844	5,333 ± 1,333	10,33 ± 1,764
HdLP (300 mg/kg)	Inicial	29,00 ± 8,185	7,000 ± 1,528	6,000 ± 0,577
	Final	37,67 ± 4,372	8,667 ± 0,882	10,00 ± 1,528
HdLP (2000 mg/kg)	Inicial	35,00 ± 5,568	9,000 ± 1,528	7,333 ± 0,333
	Final	28,67 ± 3,333	5,667 ± 0,882	10,00 ± 2,000
HdLP (5000 mg/kg)	Inicial	29,33 ± 12,72	6,333 ± 3,283	4,333 ± 1,856
	Final	34,33 ± 5,364	8,000 ± 1,155	10,33 ± 1,333

Valores estão expressos como média ± E.P.M. ($p < 0,05$ – ANOVA - Teste de Tukey).

Tabela 7 – Pesos absolutos e relativos dos órgãos (fígado, baço, rins) de animais oralmente tratados com látex de Janaguba ou HdLP em ensaio de toxicidade aguda.

Grupos (n=3)		**Peso do fígado (g) ou (g/100g)**	**Peso do baço (g) ou (g/100g)**	**Peso dos rins (g) ou (g/100g)**
Controle	Absoluto	7,924 ± 0,043	0,561 ± 0,054	1,622 ± 0,061
	Relativo	4,176 ± 0,099	0,296 ± 0,032	0,854 ± 0,019
LJ (5,4 mL/kg)	Absoluto	6,611 ± 0,255	0,464 ± 0,042	1,418 ± 0,055
	Relativo	3,826 ± 0,243	0,266 ± 0,017	0,818 ± 0,011
HdLP (300 mg/kg)	Absoluto	7,817 ± 0,932	0,552 ± 0,021	1,787 ± 0,050
	Relativo	4,036 ± 0,252	0,291 ± 0,030	0,935 ± 0,049
HdLP (2000 mg/kg)	Absoluto	7,867 ± 0,347	0,507 ± 0,0490	1,680 ± 0,109
	Relativo	4,123 ± 0,207	0,265 ± 0,022	0,879 ± 0,052
HdLP (5000 mg/kg)	Absoluto	7,998 ± 0,653	0,533 ± 0,034	1,719 ± 0,039
	Relativo	4,008 ± 0,228	0,268 ± 0,015	0,864 ± 0,020

Valores estão expressos como média ± E.P.M. ($p < 0,05$ – ANOVA - Teste de Tukey).

7. DISCUSSÃO

No Ceará, o látex de *H. drasticus* é popularmente conhecido como "Leite de Janaguba" (LJ). A pesquisa etnobotânica realizada antes do início deste trabalho mostrou que este látex é comercializado nos mercados populares do centro de Fortaleza/CE. A coleta deste látex é, por vezes, a única fonte de renda para muitas famílias da região. Os vendedores recomendam a ingestão do látex para o tratamento das mais diversas enfermidades, tais como: inflamações, tumores, gastrite e úlceras, dentre outras. Apesar de não existirem dados sobre a toxicologia desta preparação, não encontramos nenhum relato sobre adversidades oriundas do consumo diário de LJ. Como descrito anteriormente, poucos são os trabalhos relacionados a esta espécie, e antes do trabalho de Matos (2010) não havia nenhuma referência quanto ao isolamento ou atividade biológica desempenhada por macromoléculas oriundas do látex de *H. drasticus*.

Diante do exposto, o látex íntegro de *H. drasticus* (LJ) foi investigado no intuito de validar os benefícios e/ou limitações do seu tão popularmente relatado efeito antiinflamatório. Uma fração majoritariamente proteica deste látex (HdLP) foi também investigada quanto à presença de efeitos antiinflamatório, antinociceptivo e toxicológico, e um mecanismo de ação foi proposto para o primeiro efeito citado.

Neste trabalho, animais que, oralmente, receberam LJ mostraram uma significativa redução na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. O mesmo resultado foi observado quando animais receberam a fração HdLP oralmente, utilizando o mesmo modelo animal, o que sugere o envolvimento das proteínas do látex neste efeito. Uma série de estudos realizados com a fração proteica de *Calotropis procera* (espécie laticífera também pertencente à família Apocynaceae), associou a atividade antiinflamatória encontrada com a fração proteica do látex (ALENCAR *et al*., 2004; KUMAR *et al*., 2011), embora seja reconhecido que compostos não proteicos encontrados em látex também possuam relevância farmacológica (JUNCKER *et al*., 2009).

Animais também tratados com a fração HdLP (v.o.) aumentaram os níveis de óxido nítrico no plasma exatamente na mesma dose em que ocorreu a inibição da migração de neutrófilos. Na resposta inflamatória, a migração destas células é um dos eventos mais importantes a nível vascular (CARLOS e HARLAN, 1994). Elas são os primeiros leucócitos a

migrarem de forma abundante para o sítio de inflamação, sendo este um processo complexo que requer uma interação extremamente regulada entre as moléculas de adesão e o endotélio vascular (HOGG e WALKER, 1995). O efeito inibitório que altas concentrações de óxido nítrico causam na migração de neutrófilos inclui a regulação negativa da expressão das moléculas de adesão que, consequentemente, reduzem o rolamento e a adesão de leucócitos ativados sobre o endotélio (SPIECKER *et al*., 1998; SECCO *et al*., 2004).

O efeito antiinflamatório de HdLP foi potencialmente revertido quando esta fração foi administrada após a administração dos inibidores da iNOs (L-name e AG), evidenciando que o mecanismo de ação utilizado por HdLP está intrinsecamente relacionado com a síntese de óxido nítrico. Outros compostos naturais com potencial antiinflamatório também já foram relatados por possuírem um mecanismo de ação dependente da via do NO (RAMOS *et al*., 2009a; PEREIRA *et al*., 2012). Desta forma, este resultado está de acordo com outros relatos científicos, os quais mostram a relação entre inibição da migração de neutrófilos com o aumento da produção de óxido nítrico (IALENTI *et al*., 2000; PAUL-CLARK *et al*., 2001). Os animais submetidos a tratamento com LJ também aumentaram os níveis de óxido nítrico no plasma, contudo apenas na dose efetiva intermediária. Este dado, por sua vez, não vem de encontro ao obtido com HdLP. Sendo a atividade oriunda de um extrato mais heterogêneo, moléculas distintas podem estar agindo ao mesmo tempo no sítio da inflamação. Estas podem estimular ou inibir os mediadores químicos, de acordo com sua concentração. Podemos supor que o aumento na concentração de LJ gerou a atividade antiinflamatória, porém, em certo momento, as moléculas acabaram inibindo o aumento dos níveis de óxido nítrico. A dosagem realizada mensurou apenas este último estágio.

O tratamento dos animais com HdLP também apresentou uma evidente interferência nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF-α no fluido peritoneal, contudo não aumentou os níveis da citocina antiinflamatória IL-10. Citocinas pró-inflamatórias são liberadas por células residentes na fase aguda da resposta inflamatória e causam febre, inflamação, dano tecidual e, em alguns casos, choque anafilático e morte (DINARELLO, 2000). Neutrófilos também são reconhecidos por liberarem citocinas pró-inflamatórias (LI *et al*., 2007), visto que estas promovem sua auto-ativação, além de recrutarem outras células do sistema imunológico. Podemos supor que o efeito antiinflamatório de HdLP está correlacionado com eventos ocorridos no sítio da inflamação, visto à sua capacidade de interferir na síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias. Esse mecanismo, por sua vez, parece não ter a modulação por IL-10. A neutralização das citocinas ou seus receptores reduz

a migração de neutrófilos (FELDMANN e PUSEY, 2006). Desta forma, HdLP pode ter uma possível atuação sobre as citocinas, seus receptores ou sobre os neutrófilos, onde reduzindo a migração destes também gera a redução na liberação das citocinas. Este mecanismo será melhor investigado em estudos posteriores.

Além de modular antagonisticamente óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, a fração HdLP também gera efeitos sobre órgãos. Mousinho e colaboradores (2011) sugeriram que esta fração possui um efeito imunomodulatório após verificarem um aumento nas colônias de megacariócitos no baço de animais transplantados com o tumor Sarcoma 180. Nos modelos experimentais utilizados no presente trabalho, HdLP (1,0 mg/kg) não apresentou alterações no baço ou rins de animais tratados via oral. Todavia, decorridas apenas 4 horas da administração da amostra, a fração conseguiu prevenir a vacuolização e hiperplasia das células de Kupfer, provocadas pela carragenina. O fígado, por ser o responsável pelo metabolismo de drogas e outros compostos tóxicos, é o principal alvo da ação destes. De acordo com Luster e colaboradores (2001), processos inflamatórios estão diretamente envolvidos em danos nos hepatócitos, visto que um efeito tóxico local provocado por um composto químico, como a carragenina, induz a liberação de moléculas inflamatórias, as quais podem exacerbar o dano celular. HdLP, ao modular a síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias, pode ter prevenido a ação danosa desencadeada pela carragenina no fígado dos animais.

Uma nítida resposta dose-dependente para a atividade antiinflamatória de HdLP foi obtida quando esta fração foi administrada via endovenosa, resposta esta diferente da obtida por via oral. Este dado não é tão controverso, mas apenas uma clara evidência que mostra as diferenças entre estas duas vias de administração. Além disso, a natureza proteica da amostra também pode ter contribuído para o resultado de HdLP via oral. Este ponto, todavia, necessita de mais experimentos que informem que proteínas estão presentes nesta fração.

Apesar da necessidade de mais esclarecimentos sobre as proteínas da amostra, esta se mostrou resistente ao aquecimento até 30 minutos e à clivagem enzimática, conservando a atividade antiinflamatória. Esta resistência pode ter conferido à amostra o efeito farmacológico via oral. Outras proteínas de látex, como as proteínas de *Calotropis procera*, também mantiveram suas atividades biológicas mesmo após aquecimento a 100 ºC e clivagem enzimática (RAMOS *et al*., 2010).

Em adição ao efeito antiinflamatório, HdLP também foi ativa em dois modelos de nocicepção, apresentando em um deles uma porcentagem de inibição comparável à morfina. Os modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e o teste da formalina tem sido amplamente utilizados na varredura por propriedades analgésicas e antiinflamatórias de novos compostos (KAWAURA *et al*., 2009). A busca por estas substâncias torna-se importante visto que a dor é um sinal clássico da inflamação, além de ser uma das principais razões que alerta para um problema interno e motiva as pessoas a buscarem um tratamento. A literatura apresenta dados de que a inibição da migração de neutrófilos reduz a resposta nociceptiva induzida por diferentes estímulos inflamatórios (BITENCOURT *et al*., 2008). A combinação destes eventos também já foi descrita para o látex de outras espécies (PRABHA *et al*., 2008).

No ensaio de contorção induzida por ácido acético, a administração de HdLP foi capaz de reduzir as contorções em até 60%. A injeção de uma substância que cause irritação local na cavidade peritoneal libera vários mediadores, como as citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1 e IL-8 (RIBEIRO *et al*. 2000). Estes mediadores ativam nociceptores quimiosensíveis que auxiliam o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. O efeito antinociceptivo de HdLP pode estar relacionado à inibição da liberação destas citocinas em resposta ao ácido acético. No teste da formalina, a administração de HdLP causou pronunciada antinocicepção em ambas as fases do modelo. A primeira fase é caracterizada pela dor neurogênica, causada pela sensibilização direta dos nociceptores, e a segunda fase pela dor inflamatória, desencadeada por uma combinação de estímulos, incluindo a inflamação dos receptores periféricos e também a sensibilização dos mecanismos de dor central (TJOLSEN *et al*., 1992). Nesta última fase, outros mediadores estão envolvidos, dentre eles o óxido nítrico (MALMBERG e YAKSH, 1995). O resultado obtido pode então sugerir que HdLP promove ações analgésicas via sistema nervoso central e periférico. Além disso, esta atividade corrobora com o uso popular de LJ para o alívio de diversos tipos de dores.

Substâncias que induzem déficits no sistema neurológico ou muscular podem gerar resultados falso positivos quando avaliados em modelos de nocicepção. Considerando este fato, o efeito de HdLP foi investigado usando o modelo rota-rod, o qual avalia possíveis déficits neurológicos, e o teste de campo aberto, que detecta anormalidades motoras. Quando as doses efetivamente antinociceptivas de HdLP foram testadas nestes modelos, nenhuma mudança significativa foi observada em ambos os parâmetros analisados, o que indica que a veracidade da atividade antinociceptiva.

Látex é reconhecido por conter diversos tipos de metabólitos, tais como terpenóides, glicosídeos, cardenolídeos, alcalóides, compostos fenólicos, taninos, furanocumarinas, saponinas, esteróides, entre outros (EVERT, 2006; KONNO, 2011; UPADHYAY, 2011). Estes compostos, em geral não voltam ao metabolismo primário da planta (já que são produtos finais deste) e estão geralmente envolvidos na defesa contra herbívoros (AGRAWAL e KONNO, 2009; KONNO, 2011).

O triterpeno lupeol tem escassos relatos nos reinos animal e fungi (GALLO e SARACHINE, 2009), todavia é reconhecido por sua vasta ocorrência no reino vegetal (CONNOLLY e HILL, 2008). Em 2010, Lucetti e colaboradores isolaram lupeol a partir do látex íntegro de *H. drasticus* (LJ) e mostraram que esta molécula possui atividades antiinflamatórias e antinociceptivas. Neste contexto, tornou-se indispensável investigar a presença deste triterpeno em HdLP, mesmo que esta fração tenha sido obtida após uma etapa de diálise. O protocolo de isolamento do lupeol iniciou-se quando LJ foi submetido à extração em acetato de etila, seguido de cromatografia de alta pressão, purificação em coluna de sílica sob um gradiente de diclorometano/acetona e estabilização em uma mistura de hexano/diclorometano (LUCETTI *et al*., 2010). Este protocolo sugere que lupeol é drasticamente insolúvel em meio aquoso, diferindo da fração HdLP, a qual é um extrato aquoso. A cromatografia em camada delgada mostrou que HdLP não reagiu com os solventes orgânicos, enquanto o controle lupeol o fez. O ensaio qualitativo de fitoquímicos confirmou este resultado, pois também não revelou a presença de triterpenos nesta fração. Baseado nestes resultados, concluímos que a fração HdLP estava livre de contaminação com lupeol. Entretanto, neste trabalho outros metabólitos secundários foram identificados na fração HdLP: saponinas, taninos e esteróides.

Saponinas são compostos surfactantes, não voláteis, amplamente distribuídas na natureza (VINCKEN *et al*., 2007). Sua estrutura molecular tem uma combinação de elementos polares e apolares que gera a aparência "espumosa" destas moléculas em soluções aquosas. Apesar de amplamente descritas no reino Plantae, as saponinas não são muito relatadas em látex. Já foram descritas em extratos de folhas de plantas laticíferas, como *Alstonia angustiloba*, *Calotropis gigantea*, *Dyera costulata*, *Kopsia fruticosa* e *Vallaris glabrano* (WONG *et al*., 2011). Contudo, no que se refere a fluidos laticíferos, foi citada apenas no látex de *Dieffenbachia picta* Schott, popularmente conhecida como "Comigo-ninguém-pode" (HOFFMANN *et al*., 2007). Saponinas pertencem a uma classe de moléculas

que pode ter açúcares ligados à sua estrutura, e isto pode aumentar a solubilidade destas moléculas em soluções aquosas (VINCKEN *et al*., 2007).

Taninos são compostos polifenólicos basicamente localizados nos tecidos vacuolares de folhas, caules, frutos e raízes de angiospermas e gimnospermas, sendo solúveis em água a 20-35 ºC (HASSANPOUR *et al*., 2011a). Estas moléculas fazem parte de um grupo de compostos que diferem de outros compostos fenólicos (como fenóis simples, ligninas e flavonóides) quanto à sua caracterização. Enquanto estes são classificados de acordo com a estrutura química, taninos são principalmente relatados por sua habilidade em se complexar com proteínas, formando complexos solúveis ou insolúveis em água (FAHEY Jr. e JUNG, 1989; HASSANPOUR *et al*., 2011b). Além disso, estas moléculas também são capazes de se complexarem com polissacarídeos, ácidos nucleicos, esteroides, alcalóides e saponinas (CHAICHISEMSARI *et al*., 2011; MAHERI-SIS *et al*.,2011). Apesar de alguns autores relatarem a presença de taninos em látex, até o momento não há relatos específicos para a presença destas substâncias no fluido laticífero de alguma planta em específico. Todavia, taninos já foram encontrados em extratos folheares de espécies laticíferas, como *Alstonia angustiloba, Calotropis gigantea, Dyera costulata, Kopsia fruticosa* e *Vallaris glabrano* (WONG *et al*., 2011) e em extratos de frutos secos (ATANASSOVA e BAGDASSARIAN, 2009).

Os outros metabólitos encontrados em HdLP foram os esteróides livres. As plantas produzem uma gama de esteróides, os quais estão separados em classes segundo a atividade biológica desempenhada. Esta divisão é baseada em: 1) papel fisiológico na própria planta, como os hormônios; 2) substâncias aleloquímicas similares a hormônios de vertebrados; e 3) substâncias aleloquímicas planta-específica, que tem papel defensivo contra herbívoros e patógenos (DINAN *et al*., 2001). Esteróides do tipo cardenolídeos já foram encontrados no látex de algumas espécies de *Euphorbia* (NIELSEN *et al*., 1979), de *Calotropis procera* (SEIBER *et al*., 1982) e nas folhas de algumas espécies de *Asclepias* (SEIBER *et al*., 1982) e *Calotropis gigantea* (LHINHATRAKOOL e SUTTHIVAIYAKIT, 2006). Cardenolídeos são moléculas tóxicas por inibirem a Na+/K+-ATPase e, até o momento, não possuem relatos com outra atividade que não as relacionadas com a defesa de plantas (KONNO, 2011).

Todos estes compostos secundários são moléculas de baixa massa molecular, desta forma não deveriam estar presentes na fração HdLP, visto que esta passou por um processo de diálise (*cut off* 8 kDa). Estas moléculas também são geralmente isoladas em uma sequência de

solventes orgânicos, o que difere do protocolo de preparação de HdLP. Além disso, compostos secundários são resistentes a aquecimento, portanto, caso fossem responsáveis pelas atividades biológicas descritas no presente trabalho, a atividade antiinflamatória teria persistido após 60 minutos a 100 ºC, o que não ocorreu. Por esta razão, sugerimos que a detecção destes compostos secundários foi obtida exclusivamente por estarem possivelmente complexados com as proteínas ou glicoproteínas da amostra. Embora saponinas e taninos já tenham sido relatados por possuírem atividades farmacológicas, estas são raramente relacionadas à antiinflamação ou nocicepção, tendo mais destaque as atividades antiproliferativas ou antioxidantes.

Mesmo que estas moléculas detenham atividades farmacológicas, não é provável que as atividades aqui relatadas sejam desempenhadas por elas. Embora o teste tendo sido apenas qualitativo, podemos inferir que a concentração de metabólitos secundários não é predominante sobre a concentração de proteínas, sobretudo após as informações anteriormente descritas.

Independentemente dos resultados farmacológicos obtidos com o Látex de Janaguba (LJ), o estudo toxicológico tornou-se imprescindível diante do propósito de validação etnofarmacológica deste látex. Considerando este ponto, a fração HdLP também foi avaliada quanto aos sinais de toxicologia. O teste de toxicidade aguda foi baseado no guia número 423 da OECD/OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), o qual se baseia em avaliações biométricas que permitem a classificação de substâncias quanto ao seu perigo de consumo para humanos (DIENER *et al*., 1994; DIENER e SCHLEDE, 1999; VALADARES, 2006). Este método foi internacionalmente validado *in vivo* (SCHLEDE, *et al*., 1992, 1994) e, desde então, é extensivamente recomendado para estimativa da dose letal mínima (DL50).

A OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) preconiza como a dose limite do teste 2000 mg/kg de peso corpóreo, extrapolando-se para a dose excepcional máxima de 5000 mg/kg em casos de seguras informações indicando a ausência de toxicidade da amostra. Na pesquisa etnofarmacológica realizada, não houve nenhum relato de toxicidade decorrente da ingestão do látex de *H. drasticus*. A partir deste dado, neste trabalho decidimos utilizar as doses limite indicadas. A dose de LJ é administrada nos animais fazendo um paralelo com a dose recomendada para humanos, desta forma a unidade utilizada foi mL/kg de peso corpóreo. Considerando o volume suportado pelos animais, a dose escolhida

para LJ foi 10 vezes maior que a utilizada na medicina popular; enquanto para HdLP foram alcançadas as doses máximas.

LJ e HdLP não apresentaram alterações significativas nos diversos parâmetros avaliados no teste em nenhuma das doses utilizadas. Desta forma, a DL50 estimada para a *H. drasticus* é maior que 5000 mg/kg, o que a enquadra na Classe 5 de toxicidade, segundo a GHS (*Globally Harmonised System*) (OECD, 2001). Esta classe de toxicidade engloba todas as substâncias que apresentam efeitos tóxicos mínimos em doses maiores que 2000 mg/kg, mas que em certas circunstâncias podem apresentam perigo para populações vulneráveis (OECD, 2001). HdLP não apresentou tais efeitos mesmo utilizando a dose limite máxima de 5000 mg/kg, sendo, portanto, considerada segura para consumo de acordo com o teste realizado no presente trabalho.

Outras plantas laticíferas também já foram descritas quanto a seus aspectos toxicológicos, contudo não existem muitos estudos sobre a toxicologia de fluidos laticíferos em modelos animais utilizando a via oral de administração. Dentre esses escassos relatos, podemos destacar o efeito tóxico gerado pelo extrato aquoso de folhas de *Calotropis procera* Ait Br., onde a dose letal mínima de 940 mg/kg causa asfixia, convulsão, fotofobia e vômitos nos animais testados (MBAKO *et al*., 2009). No caso do látex da planta *Synadenium umbellatum* Pax., a dose de 2000 mg/kg causa alterações teciduais no fígado, rins e pulmões (CUNHA *et al*., 2009). Todavia, assim como em *Himantanthus drasticus*, outras plantas laticíferas também não apresentaram efeitos tóxicos abaixo da dose letal mínima descrita. Alguns dos exemplos são uma fração do látex de *Carica candamarcensis* (P1G10), rica em proteases cisteínicas, que na dose de 2000 mg/kg não apresentou efeitos de toxicidade (SALAS *et al*., 2010); e os extratos etanólico e aquoso do fruto de *Euphorbia hirta*, os quais nas doses letais mínimas de 2500 e 3000 mg/kg, respectivamente, também mostraram-se ausentes em sinais de toxicidade (DAS *et al*., 2010).

Tendo em vista a constante busca por novos compostos com potencialidade farmacológica e sem efeitos tóxicos para os consumidores, vemos que, assim como no látex de *C. procera*, as proteínas do látex de *H. drasticus* (HdLP) possuem os pré-requisitos fundamentais para tornar-se um fitoterápico. A ausência de toxicidade em HdLP também corrobora com o anteriormente descrito sobre os fitoquímicos encontrados nesta fração. Saponinas e taninos são considerados fatores antinutricionais para a saúde de humanos e animais (SOETAN e OYEWOLE, 2009). Todavia, sua presença em HdLP não interferiu nos

hábitos fisiológicos dos animais mesmo na dose máxima testada. Desta forma, o teste de detecção mesmo sendo apenas qualitativo, dá indícios de que a quantidade de fitoquímicos em HdLP é ínfima e estes não são os responsáveis pelas atividades farmacológicas descritas.

Também constatamos que o conhecimento popular é um importante aliado na prospecção de novas moléculas no combate a diversas enfermidades, como as inflamações. Estudos posteriores contribuirão com mais informações sobre a natureza das proteínas de HdLP, assim como poderão confirmar o mecanismo de ação utilizado na promoção das atividades biológicas descritas.

8. CONCLUSÃO

Em concordância com a medicina popular, obtivemos dados que comprovam que o látex íntegro de *Himatanthus drasticus* (LJ) possui uma potente atividade antiinflamatória por via oral. A fração proteica isolada deste látex (HdLP) parece estar envolvida neste efeito, tanto por via oral quanto endovenosa; além de também exibir atividade antinociceptiva em dois modelos de nocicepção. A via de síntese do óxido nítrico e a modulação de citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas no mecanismo de ação utilizado por estas proteínas. LJ e HdLP também não apresentam efeitos tóxicos mesmo em concentrações 5000 vezes maiores que a recomendada para ingestão, podendo ser classificada como uma substância totalmente segura para consumo (classe 5 de toxicidade, segundo a GHS).

O interesse por novos compostos que tenham estabilidade para agir farmacologicamente pela via oral e sem apresentar toxicidade vem crescendo significativamente. Se estes compostos são efetivos também por outras vias de administração o resultado torna-se mais promissor, pois a via oral não é sempre a mais adequada como, por exemplo, para pacientes criticamente doentes ou que passaram por delicados procedimentos cirúrgicos.

Em suma, estes resultados validam o uso popular do látex de Janaguba para o tratamento de enfermidades que envolvam processos inflamatórios, além de darem fortes indicativos para a futura proposição da fração proteica deste látex como um potencial fitoterápico.

9. PERSPECTIVAS

- Isolar e caracterizar a(s) moléculas(s) que promove(m) as atividades farmacológicas descritas neste trabalho;
- Repetir os ensaios biológicos realizados neste trabalho com as frações mais purificadas oriundas de HdLP;
- Entender a cinética de HdLP quando veiculada por diferentes vias de administração;
- Prospectar a ação farmacológica da fração HdLP em outros modelos experimentais, como o de sepse e coagulação;
- Propor um mecanismo de ação para as demais atividades farmacológicas encontradas;
- Realizar testes de toxicidade crônica e reprodutiva a fim de validar esta fração como uma potente candidata a fitoterápico.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Elsevier, 576p. 2008.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, 40: 311–31, 2009.

AGRAWAL, A. A.; LAJEUNESSE, M. J.; FISHBEIN, M. Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a test of phylogenetic escalation. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 128:126–38, 2008.

ALBUQUERQUE, T.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, I. S. T.; MONTENEGRO, C. T.; RAMOS, M. V. Vascular permeability, Neutrophil migration and Edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon** (Oxford), 53: 15-23, 2009.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e pespectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 678-689, 2006.

ALENCAR, N. M. N.; FIGUEREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A.; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Planta Medica**, 70: 1144-1149, 2004.

AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL. – Apocynaceae) **Revista Brasileira de Sementes**, 28 (1): 63-71, 2006.

AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.** 15th ed. The Association Arlington, VA, 1990.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, 4: 228-232, 2005.

ATANASSOVA, M.; CHRISTOVA-BAGDASSARIAN, V. Determination of tannins content by titrimetric method for comparison of different plant species. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, 44 (4): 413-415, 2009.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Soil Science Plant Analysis**, 2: 961-969, 1989.

BAGGIO, C. H.; OTOFUJI, G. D.; DE SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A. D.; TORRES, L. M. B.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. D.; MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Medica**, 71(8): 733-738, 2005.

BANI, S.; KAUL, A.; JAGGI, B. S.; SURI, K. A.; SURI, O. P.; SHARMA, O. P. Anti-inflammatory activity of the hydrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex. **Fitoterapia**, 71: 655-662, 2000.

BASU, A.; CHAUDHURI, A. K. Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 31: 319-324, 1991.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; MORALES, G. E.; FORERO, J. E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(4): 541-546, 2002.

BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R.; BEZERRA, C. C.; SILVESTRE, P. P.; VALE, M. R.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M.; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 377: 139-148, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** 72: 248-254, 1976.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo***. Campinas: Unicamp. 122p, 1994.

BROCKBANK, W. J.; LYNN, K. R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochimica and Biophysica Acta**, 578: 13-22, 1979.

BROIDE, D. H. **Inflammation cells: Structure and Function: Basic and Clinical Immunology.** Sitites, D. D. & Terr, A. I. (ed) Appletin and Lange, 141-183, 1991.

CARLOS, T. M; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, 84: 206-210, 1994.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J. L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 410–414, 2007.

CAVAILLON, J. M. Pro versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. **Cellular and Molecular Biology**, 47: 695-702, 2001.

CHAICHISEMSARI, M.; MAHERI-SIS, N.; SADAGHIAN, M.; ESHRATKHAH, B.; HASSANPOUR, S. Effects of administration of industrial tannins on nutrient excretion parameters during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. **Journal of American Science**, 7(6): 245-248, 2011.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K. Y. Beta-1,3-glucanase is hightly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis.* **Plant Molecular Biology**, 29: 397-402, 1995.

COLARES, A. V.; CORDEIRO, L. N.; COSTA, J. G. M.; SILVEIRA, E. R.; CAMPOS, A. R.; CARDOSO, A. H. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Pharmacognosy Magazine**, 4 (14): 73-77, 2008.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, 1:1397–1406, 2001.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Products Reports**, 25: 794-830, 2008.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, P.; ROBBINS. **Pathologic Basics of Diasease**. 6 ed. Saunders Campany, New York. Cap III, 48-83, 1999.

CORBETT, J. A.; TILTON, R. G; CHANG, K.; HASAN, K. S.; IDO, Y.; WANG, J. L.; SWEETLAND, M. A.; LANCASTER Jr., J. R.; WILLIAMSON, J. R.; Mc DANIEL, M. L.

Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**, 41: 552-556, 1992.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 50 (4): 434-461, 2010.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19 (2): 403-411, 2009.

DAS, P.; MEKAP, S.; PANI, S.; SETHI, R.; NAYAK, P. Pharmacological evaluation of anti–inflammatory activity of *Euphorbia hirta* against carrageenan induced paw edema in rats. **Der Pharmacia Lettre**, 2(2): 151-154, 2010.

DEWAN, S.; SANGRULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, 73: 307-311, 2000.

DIENER, W.; SCHLEDE, E. Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. **Alternatives to Animal Experimentation,** 16: 129-134, 1999.

DIENER, W.; SICHHA, L.; MISCHKE, U.; KAYSER, D.; SCHLEDE, E. The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). **Archives of Toxicology**, 68: 559-610, 1994.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **Journal of Chromatography A**, 935: 105–123, 2001.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, 118 (2): 503-508, 2000.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, 27: 519-50, 2009.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 62: 1057–1071, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric

method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, 28 (3): 350-356, 1956.

DUSSOURD, D. E.; DENNO, R. F. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. **Ecology**, 72: 1383- 1396, 1991.

ELIZABETSKY, E.; CASTILHOS, C. Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigation. **Internacional Journal of Crude Drug Research**, 28: 309-320, 1990.

EVERT, R. F. Internal secretory structures. In **Esau's Plant Anatomy** (3rd edn) (Evert, R.F.,ed.), John Wiley ; Sons, Inc, 473–501, 2006.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, 30: 344-349, 1990.

FAHEY JR., G. C.; JUNG, H. J. G. Phenolic compounds in forages and fibrous feedstuffs. In: P.R. Cheeke (ed.). **Toxic Plant Origin**., CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. (4): 123-127, 1989.

FARRELL, B. D.; DUSSOURD, D.E.; MITTER, C. Escalation of Plant Defense: Do Latex and Resin Canals Spur Pant Diversification? **The American Naturalist**, 138 (4): 881-900, 1991.

FASMER, O. B.; BERGE, O. G.; HOLE, K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests. **Neuropharmacology**, 24: 729–734, 1985.

FELDMANN, M.; PUSEY, C. D. Is there a role for TNF-alpha in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis? Lessons from other chronic inflammatory diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, 17: 1243-1252, 2006.

FENG, Q.; LU, X.; JONES, D.L.; SHEN, J.; ARNOLD, J. M. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. **Circulation**, 104: 700–704, 2001.

FERNANDEZ-ARCHE, A.; SAENZ, M. T.; ARROYO, M.; DE LA PUERTA, R.; GARCIA, M. D. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol a triperpene isolated form *Euphorbia lacteal* latex. **Phytomedicine**, 17: 146-8, 2010.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body´s alarm cells. **Agents and actions**, 10: 229, 1980.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49: 738-743, 2011.

FRENCH, A. R.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and viral infec-tions. **Current Opinion in Immunology**,15: 45-51, 2003.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, 4: 281-288, 2005.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, 3: 46-66, 2009.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; BUC, J. Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. **Mycoses**, 45: 476-481, 2002.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric Oxide and Superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 54 (4): 469-487, 2003.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. Trends in **Plant Science** 13: 631-639, 2008.

HASSANPOUR, S.; MAHERI-SIS, N.; ESHRATKHAH, B.; MEHMANDAR, F. B. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, 1 (1): 47-53, 2011a.

HASSANPOUR, S.; SADAGHIAN, M.; MAHERISIS, N.; ESHRATKHAH, B.; CHAICHISEMSARI, M. Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: in vivo study. **Journal of American Science**, 7(5): 896-900, 2011b.

HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A. S.; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. L. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias,** 6 (1): 11-21, 2007.

HOGG, J. C.; WALKER, B. A. Polymorphonuclear leucocyte traffic in lung inflam-mation. **Thorax**, 50: 819–820, 1995.

HOLLAND, T. A.; MIKOS, A. G. Advantages in drug delivery for articular cartilage. **Journal of Controlled Release**, 86: 1-14, 2003.

HOLLOWAY, A. F.; RAO, S.; SHANNON, M. F. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. **Molecular Immunology**, 38: 567-580, 2002.

HUNTER, J. Reconsidering the functions of latex. **Trees-Structure and Function**, 9:1–5, 1994.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflammation Research**, 49: 411–417, 2000.

IASP – International Association for the Study of Pain. Disponível em: http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions#Pain (Acesso em 14/01/2013).

IGBINOSA, O. O.; IGBINOSA, I. H.; CHIGOR, V. N.; UZUNUIGBE, O. E.; OYEDEMI, S. O.; ODJADJARE, E. E.; OKOH, A. I.; IGBINOSA, E. O. Polyphenolic contents and antioxidant potential of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). **International Journal of Molecular Sciences,** 12: 2958-2971, 2011.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 53: 503-514, 2002.

IMHOF, B. A.; DUNON, D. Basic mechanism of leukocyte migration. **Hormone and Metabolic Research**, 29: 621-641, 1997.

JANEWAY, J. C.; TRAVERS, P.; **The systemic immunologic in diseases**, Cap 2. London: 2006.

JUNCKER, T.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. **Biochemical Pharmacology**, 78: 1-10, 2009.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL. S. L.; Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, 4: 273-279, 2005.

KAWAURA, K.; OGATA,Y.; INOUE, M.; HONDA, S.; SOEDA, F.; SHIRASAKI, T.; TAKAHAMA, K. The centrally acting non-narcotic antitussive tipepidine produces antidepressant-like effect in the forced swimming test in rats. **Behavioural Brain Research**, 205: 315–318, 2009.

KEKWICK, R. G. O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science**. pp 1-6, 2001.

KITAJIMA, S.; KAMEI, K.; TAKETANI, S.; YAMAGUCHI, M.; KAWAI, F.; KOMATSU, A.; INUKAI, Y. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. **BMC Biochemistry**, 11: 6, 2010.

KO, R. J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Clinical Toxicology**, New York, v.37, n.6, p.697-708, 1999.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, 72: 1510–1530, 2011.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, 37: 370–378, 2004.

KOPPULA, S.; KUMAR, H.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. Reactive Oxygen Species and Inhibitors of Inflammatory Enzymes, NADPH Oxidase, and iNOS in Experimental Models of Parkinson's Disease. **Mediators of Inflammation**, 2012 (Article ID 823902): 1-16, 2012.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, 18: 412-418, 1959.

KUMAR, H. S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, 44(2): 123-125, 1994.

KUMAR, V.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 62: 1057–1071, 2002.

KUMAR, V. L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M. V.; MOHAN, M.; MATOS, M. P. V. Protective Effect of Proteins Derived from the Latex of *Calotropis procera* against Inflammatory Hyperalgesia in Monoarthritic Rats. **Phytotherapy Research**, 25: 1336–1341, 2011.

KUMAR, V. L.; SHIVKAR,Y. M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Taylor & Francis Health Sciences**, 13: 151-155, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, 1: 335-359, 1983.

LAWRENCE, T. C.; FLORES, J. V. F.; COSTA-CARVALHO, B. T. Citocinas e o defeito microbicida de leucócitos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, 29 (4): 167-175, 2006.

LEITE, G. O.; PENHA, A. R. S.; SILVA, G. Q.; COLARES, A. V.; RODRIGUES, F. F. V.; COSTA, J. G. M; CARDOSO, A. L. H.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective effects of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Pharmacology**, 1: 54-56, 2009.

LEWINSOHN, T.M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, 2: 64–68, 1991.

LHINHATRAKOOL, T.; SUTTHIVAIYAKIT, S. 19-Nor- and 1820-epoxy-cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. **Journal of Natural Products**, 69: 1249-1251, 2006.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, 25: 9–18, 2007.

LIENGPRAYOON, S.; SRIROTH, K.; DUBREUCQ, E.; VAYSSE, L. Glycolipid composition of *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**, 72: 1902-1913, 2011.

LIMA-FILHO, J. V.; PATRIOTA, J. M; SILVA, A. F. B.; FILHO, N. T.; OLIVEIRA, J.; ALENCAR, N. M. N.; VIANA, M. R . Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent

septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**,129: 327-334, 2010.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. N. H.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, 7: 60, 2010.

LUSTER, M. I.; SIMEONOVA, P. P.; GALLUCCI, R. M.; BRUCCOLERI, A.; BLAZKA, M. E.; YUCESOY, B. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. **Toxicology Letters**, 120: 317–321, 2001.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Two proteases from the latex of *Elaeophorbia drupifera*. **Phytochemistry**, 24(12): 2843-2845, 1985.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Lectins from latices of Euphorbia and Elaeophorbia species. **Phytochemistry** 25, 1553–1557, 1986a.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 25(10): 2279-2282, 1986b.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, 26: 655-657, 1987.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, 25 (3): 429-438, 2002.

MAHERI-SIS, N.; CHAICHI SEMSARI, M.; ESHRATKHAH, B.; SADAGHIAN, M.; GORBANI, A.; HASSANPOUR, S. Evaluation of the effects of Quebracho condensed tannin on faecal egg counts during naturally acquiredmixed nematode infections in Moghani sheep. **Annals of Biological Research**, 2 (2): 170-174, 2011.

MAHLBERG, P.G. Laticifers: an historical perspective. **Botanical Review**, 59: 1–23, 1993.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **Brazilian Journal of Pharmacology**, 114: 1069–1075, 1995.

MARQUES, L. M. **Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões gástricas induzidas por etanol: envolvimento da via NO/ GMPc/ K_{ATP} e da glutationa**, 2011, 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MASCOLO, N.; SHARMA, R.; JAIN, S. C.; CAPASSO, F. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, 22(2): 211-221, 1988.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará, 2º Ed., 141p., 1997.

MATOS, M. P. V. **Caracterização bioquímica parcial e investigação de atividades biológicas contra pragas agrícolas na fração protéica do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)**, 2010, 90 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MBAKO, J. D.; ADAMU, Z.; AFUTU, J. K.; ALIYU, A.; DAVID, S.; UMAR, M. B.; NDUAKA, C. Effects of the aqueous extract of fresh leaves of *Calotropis procera* on haematological and biochemical parameters in female rabbits. **African Journal of Biotechnology**, 8 (19): 5071-5075, 2009.

McDONALD, M. C.; IZUMI, M.; CUZZOCREA, S.; THIEMERMANN, C. A novel, potent and selective inhibitor of the activity of inducible nitric oxide synthase (GW274150) reduces the organ injury in hemorrhagic shock. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 53: 555-569, 2002.

MELO, V. J.; GOMES, M. T. R.; LEMOS, F. O.; DELFINO, J. L.; ANDRADE, S. P.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*, **Phytomedicine**, 15: 237–244, 2008.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100: 783-787, 2005.

METCALF, C. R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany**, 21: 115–127, 1967.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57: 1-164, 1999.

MILLIKEN, W. **Plants used in the treatment of malaria in Roraima state - Preliminary report**. Royal Botanic Garden, Kew, 67 pp., 1995.

MIRANDA, A. L. P.; SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; PINTO, A. C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, 66: 284-286, 2000.

MISHRA, L. C. **Scientific basis for Ayurvedic therapies** (1st edn). CRC Press LLC, New York, 2004.

MODESTO, M. M. L. S. **Aspectos ecológicos e sócio-econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. "janaguba" da Chapada do Araripe**. 1997. 55f. Monografia (Especialização em Botânica) – Universidade Regional do Cariri, Crato, 1997.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processo gerais.** São Paulo: Atheneu, p. 233, 1999.

MOORE, K. W.; DE WAAL, M. R.; COFFMAN, R. L.; O' GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, 19: 683-765, 2001.

MORCELI, P. **Borracha natural: situação atual e perspectiva.** Brasília: CONAB, 2003.

MORCELLE, S. R., CAFFINI, N. O., PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, 75: 480-493, 2004.

MOTA, M. R. L.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N.; GOMES, R. C.; MEIRELES, A. V. P.; GADELHA, T. S.; GADELHA, C. A.; OLIVEIRA, C. C.; BENEVIDES, R. G.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 374: 1-10, 2006.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga hemorrhoidalis* fallen. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology,** 27(2): 505-514, 1997.

MOUSINHO, K. C.; OLIVEIRA, C. C.; FERREIRA, J. R. O.; CARVALHO, A. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MATOS, M. P. V.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O. Antitumor effect of

laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, 137: 421-426, 2011.

MOUSSAOUI, A. E.; NIJS, M.; PAUL, C.; WINTJENS, R.; VINCENTELLI, J.; AZARKAN, M.; YVAN L. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cell Molecular Life Science**, 58: 556–570, 2001.

MULLA, W.A.; KUCHEKAR, S.B.; THORAT, V.S.; CHOPADE, A.R.; KUCHEKAR, B.S. Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic axtract of leaves of *Alocasia indica* (Schott.). **Journal of Young Pharmacists**, 2: 137–143, 2010.

MULLIGAN, M. S.; PAULSON, J. C.; FREEST, S.; ZHENG, Z.; LOWE, J. B. Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependentlung injury. **Search Journal Nature**, 364: 149-151, 1993.

NARDIN, J. M.; DE SOUZA, W. M.; LOPES, J. F.; FLORAO, A.; SANTOS, C. A. D.M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. **Planta Medica**, 74 (10): 1253-1258, 2008.

NIELSEN, P. E.; NISHIMURA, H.; LIANG, Y.; CALVIN, MELVIN. Steroids from *Euphorbia* and other latex-bearing plants. **Phytochemistry**, 18: 103-104, 1979.

NOVAS, M. L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and anxioenic effects of n-butyl-h-carboline-3- carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 30: 331–336, 1988.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Acute Toxic Class Method** (Guideline 423), 2001.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 382: 139-149, 2010.

OLIVEIRA, R. S. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; FREITAS, L. B.; PINHEIRO, R. S.; BRITO, G. A.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V.; RALPH, M. T.; LIMA-FILHO, J. V. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera*

(Asclepiadaceae) protects against Salmonella infection in a murine model of typhoid. **Inflammation Research**, 61: 689-698, 2012.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiology Reviews**, Bethesda, 87(1): 315-424, 2007.

PALMER, R. M. J; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524–526, 1987.

PATEL, A. K., SINGH, V. K., MOIR, A. J., JAGANNADHAM, M. V. Biochemical and spectroscopic characterization of morning glory peroxidase from an invasive and hallucinogenic plant weed *Ipomoea carnea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 9236–9245, 2008.

PAUL-CLARK, M. J.; GIRLOY, D. W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D. A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **Journal of Immunology**, 2: 1169–1177, 2001.

PELAIA, G.; VATRELLA, A.; CUDA, G.; MASELLI, R.; MARSICO, S. A. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. **Life Sciences**, 72: 1549-1561, 2003.

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 67(9): 1322-3, 1978.

PEREIRA, L. P.; SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H. S. F.; SILVA, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, 139: 642– 648, 2012.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**, 1-11, 2007.

PLUMEL, M. M. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae). Revisión taxonomique: bradea. **Boletim do Herbarium Bradeanu**, Rio de Janeiro, 5: 1-20, 1991.

POSCH, A.; CHEN, Z.; WHEELER, C.; DUNN, M. J.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BAUR, X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **Journal of Allergy and Clinical immunology**, 99: 385-395, 1996.

PRABHA, M. N.; RAMESH, C. K.; KUPPAST, I. J.; MANKANI, K. L. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia tirucalli* L. latex. **International Journal of Chemical Sciences**, 6: 1781-1787, 2008.

PU, X. C.; WONG, P. T.; GOPALKRISHNAKONE, P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, 33: 1425–1431, 1995.

RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO, L. L. P.; SALES, M. P.; SOUSA, D. P.; CARLINI, C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from C. procera: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, 173: 349-357, 2007.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod-Plant Interactions**, 4:57–67, 2010.

RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. S.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I. S. T.; KUMAR, V. L.; BITENCOURT, F. S.; CUNHA, F. Q.; OLIVEIRA, R. S. B.; BOMFIM, L. R.; LIMA-FILHO, J. V.; ALENCAR, N. M. N. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, 125: 387-392, 2009a.

RAMOS, M. V.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T.; CAVALHEIRO, M. G.; MATOS, M. P. V; CARVALHO, A. F. U. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104 (6): 805-812, 2009b.

RAMOS, M. V.; VIANA, C. A.; SILVA, A. F. B.; FREITAS, C. D. T.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA-FILHO, J. V. M.; KUMAR, V. L. Proteins derived from latex of *Calotropis procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 385(5):455-63, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Pharmacology**. 5 ed., Elsevier, 2003.

RATTMANN, Y. D.; TERLUK, M. R.; SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A.; BIAVATTI, M. W.; TORRES, L. B.; MESIA-VELA, S.; RIECK, L.; SILVA-SANTOS, J. E.; MARQUES, M. C. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 268–275, 2005.

REBOUÇAS, S. O.; GRIVICICH, I.; SANTOS, M. S.; RODRIGUEZ, P.; GOMES, M. D.; OLIVEIRA, S. Q.; SILVA, J.; FERRAZ, A. B. F. Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus articulatus* bark, on human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, 926-929, 2011.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Pharmacology**, 101: 746-752, 1990.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macro-phages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, 387: 111–118, 2000.

ROBBINS, S. S.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Pathologic basis of diseases. Cap 3: inflammation and repair**. Philadelphia: Saunders W. B., 2004.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **As bases patológicas das doenças. Cap 3: Inflamação e reparo.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 48-79, 2005.

ROSS, R.; RESKE-KUNZ, A. B. The role of nitric oxide in contact hypersensitivity. **International Immunopharmacology**, 1:1469–1478, 2001.

SALAS, C.; VILLALBA, M. I.; MELLO, V.; BILHEIRO, R.; CASSALI, G.; TAGLIATI, C.; LOPES, M.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.; ANADON, A. Oral subchronic toxicity evaluation of a latex proteolytic fraction from *Carica candamarcensis*. **Toxicology Letters**, 196: 258, 2010.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Methods in Molecular Biology**, 225: 291–303, 2003.

SAUNDERS, B. M.; TRAN, S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J. D.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Immunology**, 174: 4852-4859, 2005.

SCHLEDE, E.; MISCHKE, U.; DIENER, W.; KAYSER, D. The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). **Archives of Toxicology**. 69: 659-670, 1994.

SCHLEDE, E.; MISCHKE, U.; ROLL, R.; KAYSER, D. A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method –An Alternative to the LD50 Test. **Archives of Toxicology**, 66: 455-470, 1992.

SCHWENTER, A.; VODOVOTZ, Y.; WELLER, R.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric Oxide**, 7: 1-10, 2002.

SECCO, D. D.; PARON, J. A.; DE OLIVEIRA, S. H.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, 9: 153–164, 2004.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D.A. **Initiation of inflammatory response and its prevention.** In: BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. Handbook of Inflammation. Elsevier, 5: 25-47, 1985.

SEIBER, J. N.; NELSON, C. J.; LEE, S. M. Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemsitry**, 21: 2343–2348, 1982.

SEQUEIRA, B. J.; VITAL, M. J. S.; POHLIT, A. M.; PARAROLS, I. C.; CAÚPER , G. S. B. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104(4): 659-66, 2009.

SETHI, A.; MCAUSLANE, H. J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUESSLY, G. S.; NAGATA, R.T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, 35: 190–200, 2009.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 18 (3): 385-405, 2004.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediator of Inflammation**, 12(5): 299-302, 2003.

SILVA, J. R. D. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. D. S., Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Quimica Nova**, 21 (6): 702-704,1998.

SILVA, L. M. C. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P.G.; RODRIGUES, J. A. G.; LIMA, M. E. P.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities

of lectin from marine red alga *Pterocladiella capillacea*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 5: 830–835, 2010.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAM, M. V.; DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, 45 (3): 399-406, 2010.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* - a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. Journal **of Pharmacological and Toxicological Methods**, 43: 219- 224, 2000.

SIQUEIRA, J. R.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação.** Rio de Janeiro: Medsi, p. 238, 2000.

SMITH, A. J. P.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 20: 43–59, 2009.

SNOOK, M. E. Characterization and quantification of hexadecyl, octadecyl and eicosyl esters of p-coumaric acid in the vine and root latex of sweetpotato [Ipomoeabatatas (L.)Lam.]. **Journal of Agricutural and Food Chemistry**. 42: 2589–2595, 1994.

SOARES, D. C.; ANDRADE, A. L. S.; DELORENZI, J. C.; SILVA, J. R. A.; FREIRE-DE-LIMA, L.; FALCÃO, C. A. B.; PINTO, A. C.; ROSSI-BERGMANN, B.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology International**, 59: 173 –177, 2010.

SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCINIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 99:125–129, 2005.

SOBRAL, F. R. S. **Proposta de guia para a realização de estudos não clínicos de segurança, necessários ao desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos**, 2006, 109 f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Vigilância Sanitária) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SOETAN, K. O.; OYEWOLE, O. E. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. **African Journal of Food Science**, 3 (9): 223-232, 2009.

SOUSA, E. L.; GRANGEIRO, A. R. S.; BASTOS, I. V. G. A.; RODRIGUES, G. C. R.; SILVA, M. J.; ANJOS, F. B. R.; SOUZA, I. A.; SOUSA, C. E. L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 46 (2):199-203, 2010.

SOUZA, D. P. **Proteínas inibidoras de fitopatógenos em fluidos laticíferos: atividade e mecanismo de ação**, 2010, 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflammed peritoneal cavity. **Agents Actions**, 17: 1-5, 1985.

SOUZA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. G. O. M.; SIANI, A. C. Inhibition of nitric oxide and interferon-γ production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus sucuuba*. **Pharmacognosy Magazine**, 2: 216-129, 2006.

SOUZA, W. M.; BREHMER, F.; NAKAO, L. S.; STINGHEN, A. E. M.; SANTOS, C. A. M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17: 191-196, 2007.

SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E.; SANTOS, C. A. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. **Fitoterapia**, 75: 750-753, 2004.

SPIECKER, M.; DARIUS, H.; KABOTH, K.; HUBNER, F.; LIAO, J. K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **Journal of Leukocyte Biology**, 63: 732–739, 1998.

SPINA, A. P.; KINISHITA, L. S.; BITTRICH, V. Revisão taxonômica do gênero *Himatanthus* (Apocynaceae: Rauvolfioideae - Plumerieae) e estudos de filogenia e biogeografia. II – Tratado Taxonômico. In: **54º Congresso Nacional de Botânica, 3º Renião Amazônica de Botânica**, livro de Resumos R-0987 Universidade da Amazônia – UNAMA, Belém PA, 13 a 18 de julho, 2003.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis.* **Phytochemistry**, 67(15): 1644-1650, 2006.

STOWE, D. F.; HEISNER, J. S.; CHUNG, W. W.; FUJITA, S. Volatile anaesthetics restore bradykinin and serotonin-induced coronary vasodilation after blocking nitric oxide synthase:

lack of anaesthetic effects on KATP channels and prostaglandin pathways. **European Journal of Anaesthesiology**, 18: 219-230, 2001.

TAIRA, T.; OHDOMARI, A.; NAKAMA, N.; SHIMOJI, M.; ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of Gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex Chitinases: Both the chitin-binding and the antifungal activities of class I Chitinases are reinforced with increasing ionic strength. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 69: 811-818, 2005.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5–17, 1992.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42 (2): 289-306, 2006.

UPADHYAY, R. K. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. **International Journal of Green Pharmacy**, 5: 169-80, 2011.
VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a era do teste DL50. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3(2): 93-98, 2006.

VILCEK, J.; FELDMAN, M.; Historical review: cytokines as therapeutic and targets of therapeutics. **In trends Pharmacologic sciences**, 25 (4): 201-209, 2004.

VIERSTRA, R. D. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, 32: 275-302, 1996.

VIJAYAN, P.; RAGHU, C.; ASHOK, G.; DHANARAJ, S. A.; SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal of Medical Research**, 120: 24-29, 2004.

VINCKEN, J. P.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, 68: 275–297, 2007.

WALLER, D. P. Methods in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 38: 189-195, 1993.

WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of cucurbit phloem exudates reveals a network of defense proteins. **Phytochemistry**, 65: 1795–1804, 2004.

WASANO, N.; KONNO, K.; NAKAMURA, M.; HIRAYAMA, C.; HATTORI, M.; TATEISHI, K. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. **Phytochemistry**, 70: 880–888, 2009.

WITITSUWANNAKUL, R.; PASITKUL, P.; KANOKWIROON, K.; WITITSUWANNAKUL, D. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. **Phytochemistry,** 69: 339–347, 2008.

WONG, M. M.; FISH, E. M. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**, 15: 5-14, 2003.

WONG, S. K.; LIM, Y. Y.; ABDULLAH, N. R; NORDIN, F. J. Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 11: 3-9, 2011.

WOOD, C. A.; LEE, K.; VAISBERG, A. J.; KINGSTON, D. G.; NETO, C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spirolactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), 49 (11): 1477-1478, 2001.

WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D. L.; MEEKING, D. R.; ALLARD, S. E.; MUNDAY, L. J.; SHAM, K. M.; CUMMINGS, M. H. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, 22: 697-702, 2005.

YOUSIF, M. H. M. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ diabetic rats: Role of EDNO and EDHF. **Pharmacology Research**, 51: 515-521, 2005.

YU, H. L.; FENG-ZHANG; LI,Y. J.; GONG, G. H.; QUAN, Z. S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-*a*]phthalazine in mice. **Pharmacological Reports**, 64: 1155-1165, 2012.

ANEXOS

ANEXO I – Parâmetros de *screening* hipocrático utilizados no ensaio de toxicologia aguda com LJ e HdLP (Brito, 1994).

Parâmetro	Sinais de toxicidade	Escores
Atividade geral	Avaliação da atividade geral do animal na gaiola após estímulo. Dentre os sinais estão locomover, levantar, farejar, ficar parado, etc.	0 – não se move 1 – dá um passo 2 - meia-volta na gaiola 3- duas voltas na caixa ou movimentos de alerta (padrão) 4- anda com agilidade
Sistema sensorial		
Frênito vocal	Emissão de som vindo da região torácico-abdominal sem estímulo ou toque.	0 – ausente 1- presente
Irritabilidade	Resposta do animal após toque e sopro na face.	0 – ausente 1- presente
Reflexo auricular	Posição da orelha após vários estalos consecutivos; quanto mais próxima da cabeça menor será o reflexo.	0 – ausente, orelha colada à cabeça 1 – orelha ligeiramente colada na cabeça 2 – orelha em pé pela metade 3- orelha em posição usual (padrão) 4- orelha totalmente em pé
Reflexo corneal	Reflexo dos olhos após a aproximação lenta de uma pinça, mas sem o toque.	0 – olhos ficam abertos 1 – quase não se movem 2 – movem-se pouco e lentamente 3- fecham pela metade quando a pinça se aproxima 4- fecham totalmente quando a pinça se aproxima (padrão)
Aperto de cauda	Resposta ao aperto intenso da extremidade da cauda com uma pinça.	0 – não se move 1 – move-se lentamente 2 – move-se rápido 3- move-se e pula (padrão) 4- move-se, pula e corre
Resposta ao toque	Resposta ao toque prolongado (mais de 15 segundos) com uma pinça.	0 – não se move 1 – pouco movimento 2 – dá um passo 3- anda com dificuldade 4- anda com agilidade (padrão)

Parâmetro	Sinais de toxicidade	Escores
Sistema psicomotor		
Contorção	Movimento vermiforme do corpo	0 – ausente (padrão) 1- presente
Trem posterior	Verificar se a postura das patas traseiras (trem posterior) está caída ou arrastando	0 – ausente (padrão) 1- queda do trem posterior pouco visível 2 - queda do trem posterior visível; animal anda com lentamente 3- queda do trem posterior visível; animal anda com dificuldade 4 - queda do trem posterior visível; animal anda com dificuldade e arrasta o trem posterior
Reflexo de endireitamento	Resposta do animal para voltar à posição normal quando é colocado com o dorso sobre uma superfície (máximo 15 s)	0 – não se move 1- volta lentamente e com dificuldade 2- volta lentamente 3 – volta rápido 4- volta imediatamente e com agilidade (padrão)
Tônus corporal	Verificar se o corpo esta normal (presente) ou não.	0 – ausente 1 – presente (padrão)
Força para agarrar	Intensidade com que o animal se agarra a uma grade quando esta tem sua posição levemente modificada.	0 – não se agarra 1 – se agarra, mas em seguida larga a grade 2 – segura por um tempo, mas cai 3- segura firmemente, mas não suporta e cai 4- segura firmemente e não cai (padrão)
Ataxia	Movimentos desordenados devido a oscilações entre estados de consciência e insconsciência.	0 – ausente (padrão) 1 - presente

Parâmetro	Sinais de toxicidade	Escores
Sistema nervoso central		
Tremores	Observar presença ou não.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Convulsões	Observar presença ou não.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Straube tail	Verificar se a cauda está ereta ou normal.	0 – normal (padrão) 1 - ereta
Hipnose	Animal quieto e sem movimento, mas se tocado abre os olhos e responde ao estímulo.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Anestesia	Ausência de resposta ao estímulo doloroso com perda do reflexo de endireitamento.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Sistema nervoso autônomo		
Ptose	Pálpebras fechadas ou semi-fechadas mesmo após estímulo.	0 – ausente (padrão) 1 – ligeiramente fechado 2- semi-fechado 3- quase totalmente fechado 4- fechado
Lacrimação	Presença ou ausência.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Micção	Número de micções.	Número de poços de urina.
Defecação	Número de bolos fecais.	Número de pellets de excreta.
Piloereção	Ereção dos pelos corpóreos.	0 – ausente (padrão) 1 – ereção leve 2- grau ligeiramente maior que o anterior 3- visível, mas não totalmente ereto 4- totalmente ereto
Hipotermia	Temperatura do corpo do animal abaixo do normal (avaliar sobretudo as extremidades).	0– ausente (padrão) 1– ligeiramente frio 2- frio 3- gelado 4- gelado e com cianose
Respiração	Normal, hiper ou hipoventilação	0– normal (padrão) 1– ligeiramente acelerado 2- mais acelerado 3- muito acelerado 4- ofegante
Cianose	Pontos com coloração anormal no corpo, sobretudo nos pés, patas e focinhos.	0– ausente (padrão) 1- cor esbranquiçada 2- cor levemente azulada 3- cor levemente arroxeada 4- cor totalmente arroxeada

ANEXO II – Resumo do artigo publicado na revista *International Journal of Indigenous Medicinal Plants* - ISSN:2051-4263, Vol.29, Issue.1, 2013 (fator de impacto 3,51 – Qualis A2).

ETHNOPHARMACOLOGICAL USE and PHARMACOLOGICAL ACTIVITY of LATEX from *HIMATANTHUS DRASTICUS* (MART.) PLUMEL

Mayara Patrícia Viana de Matos[1], Raquel Sombra Basílio de Oliveira[2], Nylane Maria Nunes Alencar[3], Ingrid Samantha Tavares Figueiredo[2], Jefferson Soares de Oliveira[4], Bárbara Jéssica dos Santos Amaral[1], Beatriz Caroline Nishi[1], Márcio Viana Ramos[1]

[1] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil
[2] Faculdade Estácio do Ceará Via Corpus Rua Eliseu Uchoa Becco, nº 600 - Bairro Água Fria CEP: 60810-270, Fortaleza, Ceará, Brazil
[3] Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil
[4] Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

ABSTRACT

Background: *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) is known locally as janaguba in northeastern Brazil. Latex obtained by cutting its stem bark is mixed with water and sold in public markets. People use janaguba milk (JM) to treat and prevent different inflammatory disorders and cancer, among other uses. However, there is not enough information confirming these pharmacological properties. **Aim of the study:** Here, this preparation of janaguba was investigated in an attempt to measure its anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. **Methodology/Results:** Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects were investigated by established methods: carrageenan-induced neutrophil migration in rats and acetic acid-induced writhing and formalin-induced nociception tests in mice. JM inhibited the inflammatory response induced by carrageenan in rats, independent of the route of administration. It significantly reduced the infiltration of neutrophils into the peritoneal cavity (96%, $p<0.05$) concomitant with increased nitric oxide synthesis in plasma (54%, $p<0.05$). Further, the anti-inflammatory properties were shown to be associated with the protein fraction of JM (HdLP). HdLP exhibited anti-inflammation, even after heat-treatment (100 °C, 30 min) or proteolysis. It suppressed abdominal constrictions in acetic acid-treated mice and reduced paw licking induced by formalin, both in a dose-dependent manner. **Conclusions:** It is therefore concluded that the latex of *Himatanthus drasticus* exhibits both the anti-inflammatory and anti-nociceptive activities claimed by its users. The protein fraction of the latex is an important contributor to the pharmacological properties of JM. Resistance to heat and proteolytic treatment can explain the effectiveness of HdLP even when administered orally.