



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

GABRIELA FERNANDES OLIVEIRA MARQUES

ESTUDO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO CHÁ E
DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS CASCAS DE *Ximenia americana L.* EM
MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E ARTRITE INDUZIDOS POR ZIMOSAN
EM ROEDORES

FORTALEZA

2020

GABRIELA FERNANDES OLIVEIRA MARQUES

ESTUDO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO CHÁ E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS CASCAS DE *Ximenia americana L.* EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E ARTRITE INDUZIDOS POR ZIMOSAN EM ROEDORES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy.

Coorientador: Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro.

FORTALEZA

2020

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

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

M317e Marques, Gabriela Fernandes Oliveira.
Estudo da toxicidade e da atividade anti-inflamatória do chá e dos polissacarídeos obtidos das cascas de *Ximenia americana* L. em modelos de inflamação aguda e artrite induzidos por zimosan em roedores / Gabriela Fernandes Oliveira Marques. – 2020.
121 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy.

Coorientação: Profa. Dra. Rondinelle Ribeiro Castro.

1. Artrite experimental. 2. Inflamação aguda. 3. Plantas medicinais. I. Título.

CDD 660.6

GABRIELA FERNANDES OLIVEIRA MARQUES

ESTUDO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO CHÁ E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS CASCAS DE *Ximenia americana L.* EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E ARTRITE INDUZIDOS POR ZIMOSAN EM ROEDORES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Maria Gonçalves Pereira
Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central (FECLESC/UECE)

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio Barros da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Eduardo Honório Ribeiro Júnior
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Ao meu filho, Raul Marques Domingos.

Ao meu sobrinho, Valentim Braga Fernandes.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy, por ter me conduzido da melhor forma neste caminhar científico. Por cada estímulo e apoio durante esses 12 anos de parceria. Este é meu maior exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência. Muita gratidão!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro, pelas contribuições valiosas durante a construção deste trabalho.

À profa. Dra. Maria Gonçalves Pereira, pelo apoio, pela participação na banca examinadora e por ceder o material utilizado neste estudo.

Aos demais professores que aceitaram participar da banca examinadora: Prof. Dr. Paulo Goberlanio de Barros Silva, Prof. Dr. Gislei Frota Aragão e Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior, pelo tempo dedicado à leitura do trabalho e pelas colaborações e sugestões bastante pertinentes.

À minha amiga, Profa. Dra. Alana de Freitas Pires, por toda a orientação e conhecimento que repassou de uma forma tão leve para mim. Muito do que sou e quero ser é consequência dos nossos bons anos de convivência. Muito obrigada!

Aos amigos do LAFFIN, pelos bons anos de convivência, pela ajuda nos experimentos, por fazer parte de momentos críticos, mas que contribuíram muito para a construção da minha vida de cientista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais (PPGBiotec-UFC) e aos professores de todas as disciplinas, pela importante contribuição e repasse de conhecimento agregado à minha formação.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro durante o período do doutorado.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pela oportunidade de formação de qualidade.

À Universidade Estadual do Ceará, pela grande contribuição na minha carreira acadêmica. Nesta instituição eu concluí minha graduação (licenciatura e bacharelado), mestrado, e desenvolvi todos os projetos de pesquisa que fazem parte do meu currículo. Muito grata!

Ao Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), pela cessão dos animais para que este trabalho pudesse ser concluído.

Aos animais de experimentação, porque tiveram suas vidas dedicadas à conclusão deste trabalho.

À toda minha família e meus amigos, que sempre acreditaram em mim e me estimularam a chegar até aqui. Precisei, preciso e precisarei da força e da torcida de cada uma destas pessoas! Quem se sente parte da minha história vai se considerar citado neste agradecimento.

Reforço minha gratidão e admiração à todos. Cada um construiu algum caminho que foi importante para a minha linha de chegada (e de muitas partidas que virão a partir de agora)! Muito obrigada.

“Tudo aquilo que o homem ignora não existe para ele. Por isso, o universo de cada se resume no tamanho do seu saber.”

Albert Einstein

RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença articular grave, que acomete 0,5-1% da população mundial, caracterizada pelo comprometimento de articulações periféricas, sinovite persistente e dor. A terapêutica desta patologia inclui o uso de anti-inflamatórios/analgésicos, demandando elevados custos, e envolvendo sérios efeitos colaterais. O uso de plantas medicinais tem sido uma prática popular universal, que as habilitam como ferramentas de estudos etnofarmacológicos. *Ximenia americana* (família Olacaceae) ou “ameixa-do-sertão” é uma planta usada na medicina popular do Nordeste brasileiro que possui diversos compostos bioativos em sua composição, dentre eles os polissacarídeos. Várias partes da planta são utilizadas na medicina popular para tratamento de transtornos inflamatórios e/ou dolorosos. Estudos envolvendo modelos experimentais de inflamação aguda e crônica em roedores, demonstraram ação anti-inflamatória de seus extratos polissacarídicos e suas frações. Adicionalmente, o extrato aquoso e as frações polissacarídicas apresentaram ação antinociceptiva em modelo de pancreatite em camundongos. Além disso, o chá das cascas inibe parâmetros inflamatórios em modelo experimental de gastrite. Diante do exposto, este estudo tem como foco a investigação do efeito envolvido na ação antiinflamatória do chá e dos polissacarídeos das cascas de *Ximenia americana* em modelos de inflamação aguda e de artrite induzidos por zimosan, bem como a toxicidade decorrente do seu tratamento. O chá (50, 100, 150 mg/kg; v.o.), contendo carboidratos (44,8 %) e polifenóis (28,3%); e frações polissacarídicas (FI, FII: 1 mg/kg; e.v.) foram administrados em Camundongos Swiss antes (indução do edema ou peritonite) ou em Ratos Wistar após (indução de artrite) a estimulação com zimosan. Em seguida, as avaliações dos parâmetros inflamatórios (edema, migração celular, hipernocicepção, análises histopatológicas) foram feitas de 0 a 24 horas, e até o 14º dia, para as demais avaliações (parâmetros hematológicos, bioquímicos plasmáticos, histopatológicos e comportamentais). Os resultados do estudo mostraram que o chá e os polissacarídeos de *X. americana* inibem parâmetros inflamatórios como o edema, migração celular e dor, tanto visceral como articular, induzidas por zimosan. Além disso, os dados também sugerem que o uso do chá por via oral é relativamente seguro, visto não ter apresentado letalidade, ou induzido alterações fisiológicas e/ou comportamentais significativas nos animais. Este estudo é relevante porque valida cientificamente o uso popular desta planta em processos inflamatórios e dolorosos.

Palavras-chave: artrite experimental; inflamação aguda; plantas medicinais.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe arthropathy that affects 0.5-1% of world population, characterized by peripheral joints impairment, persistent synovitis and pain. The therapeutical approach of this pathology includes anti-inflammatory/analgesic drugs and implies high costs, and involving serious side effects. The use of medicinal plants has been a universal popular practice, which enables them as tools of ethnopharmacological studies. *Ximenia americana* (Olacaceae family) or “ameixa-do-sertão” is used popularly in Northeast Brazil, contains a diversity of bioactive compounds, including polysaccharides. Several parts of the plant are used in folk medicine to treat inflammatory and/or painful disorders. Studies involving experimental models of acute and chronic inflammation in rodents, have demonstrated anti-inflammatory action of its aqueous and hydroethanolic extracts. Additionally, the aqueous extract and the polysaccharide fractions showed antinociceptive action in a model of pancreatitis in mice. In addition, tea of the barks inhibits inflammatory parameters in an experimental gastritis model. Thus, this study focuses on investigating the effect and mechanisms involved in the anti-inflammatory action of tea and polysaccharides from the barks of *Ximenia americana* in models of acute inflammation and arthritis induced by zimosan, as well as the toxicity resulting from its treatment. Tea (50, 100, 150 mg/kg; v.o.), containing carbohydrates (44.8%) and polyphenols (28.3%); and polysaccharide fractions (FI, FII: 1 mg/kg; e.v.) were administered to Swiss Mice before (induction of edema or peritonitis) or to Wistar Rats after (arthritis induction) stimulation with zimosan. Then, the evaluations of the inflammatory parameters (edema, cell migration, hypernociception, histopathological analyzes) were made from 0 to 24 hours, and until the 14th day, for others evaluations (hematological, plasma biochemical, histopathological and behavioral parameters). The results of the study showed that tea and polysaccharides from *X. americana* inhibited inflammatory parameters such as edema, cell migration and pain, both visceral and articular, induced by zimosan. In addition, the data also suggest that the use of tea by mouth is relatively safe, as it has not shown any lethality, or has induced significant physiological and/or behavioral changes in animals. This study is relevant because it scientifically validates the popular use of this plant in inflammatory and painful processes.

Keywords: experimental arthritis; acute inflammation; medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.....	27
Figura 2 – Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios	29
Figura 3 – <i>Ximenia americana</i> L.	32
Figura 4 – Análise do chá de <i>X. americana</i> por espectroscopia de infravermelho.....	37
Figura 5 – Efeito inibitório do chá e das frações polissacarídicas (FI e FII) de <i>X. americana</i> sobre o edema de pata induzido por zimosan.....	38
Figura 6 – Efeito inibitório da fração polissacarídica FII de <i>X. americana</i> sobre parâmetros inflamatórios induzidos por zimosan no modelo de peritonite....	39
Figura 7 – Estrutura do proteoglicano	49
Figura 8 – O papel dos neutrófilos na AR	53
Figura 9 – Vias de ativação de nociceptores na dor da AR	55
Figura 10 – Efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquema de pré e pós tratamento	65
Figura 11 – Curva dose-resposta do efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan	66
Figura 12 – Curva de duração do efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> na artrite induzida zimosan	67
Figura 13 – Efeito inibitório da fração FII desproteïnada de <i>X. americana</i> sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan.....	68
Figura 14 – Efeito comparativo do chá de <i>X. americana</i> após desproteïnização sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan	69
Figura 15 – Avaliação histopatológica das articulações dos animais tratados com o chá e a fração FIId de <i>X. americana</i>	71
Figura 16 – O tratamento oral com o chá de <i>X. americana</i> reduz os níveis de nitrito nas articulações de ratos	73
Figura 17 – Relação de Plantas Medicinais do SUS – RENISUS	85
Figura 18 – Efeito do tratamento do chá das cascas de <i>X. americana</i> sobre a atividade exploratória 60 minutos após administração	92
Figura 19 – Efeito do tratamento do chá das cascas de <i>X. americana</i> sobre a atividade exploratória 7 dias após administração	93
Figura 20 – Efeito do tratamento do chá das cascas de <i>X. americana</i> sobre a atividade exploratória 14 dias após administração	93

Figura 21 – Efeito do tratamento do chá das cascas de <i>X. americana</i> sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos 14 dias após administração	99
Figura 22 – Massa corporal dos animais tratados com o chá de <i>X. americana</i>	99
Figura 23 – Análise histopatológica do estômago	101
Figura 24 – Análise histopatológica do baço	102
Figura 25 – Análise histopatológica do fígado	103
Figura 26 – Análise histopatológica do rim	104
Figura 27 – Análise histopatológica do cérebro.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Rendimento e análise química do chá e das frações polissacarídicas de <i>X. americana</i>	36
Tabela 2 –	Análise histopatológica do perfil anti-inflamatório do chá e da fração FII desproteinada de <i>X. americana</i>	72
Tabela 3 –	Efeito do chá de <i>X. americana</i> no SNC	95
Tabela 4 –	Efeito do chá de <i>X. americana</i> no SNA	96
Tabela 5 –	Efeito do chá de <i>X. americana</i> no sistema somatossensorial	97
Tabela 6 –	Efeito do chá de <i>X. americana</i> sobre parâmetros hematológicos	98
Tabela 7 –	Massa relativa dos órgãos dos animais tratados com o chá de <i>X. americana</i> .	100
Tabela 8 –	Escores da análise de histopatológica do estômago	101
Tabela 9 –	Escores da análise de histopatológica do baço	102
Tabela 10 –	Escores da análise de histopatológica do fígado	103
Tabela 11 –	Escores da análise de histopatológica do rim	104
Tabela 12 –	Escores da análise de histopatológica do cérebro	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	Adamlisina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
APS	Atenção Primária à Saúde
AR	Artrite Reumatóide
ASC	Área sob a curva
COX	Ciclooxigenase
CGPR	Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
DMARDs	Medicamentos modificadores do curso da doença
EPM	Erro padrão da média
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho
GAGs	Glicosaminoglicanos
GCs	Glicocorticóides
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos
GSH	Glutathiona reduzida
H & E	Hematoxilina e eosina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular-2
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucinas
LTB4	Leucotrieno B4
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloprotease de matriz
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PCAM-1	Molécula de adesão de célula endotelial e plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLT	Polissacarídeos Totais
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SOD	Superóxido dismutase
SISGEN	Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e dos Conhecimentos Tradicionais Associados
SP	Substância P
TCA	Ácido tricloroacético
TIMP	Inibidores tissulares de metaloproteases
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	CAPÍTULO I	17
1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Geral	23
2.2	Específicos	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	Aspectos gerais do Processo Inflamatório	24
3.1.1	<i>Eventos vasculares da Inflamação</i>	25
3.1.2	<i>Eventos celulares da Inflamação</i>	25
3.1.3	<i>Dor Inflamatória</i>	27
3.1.4	<i>Terapia Anti-inflamatória</i>	28
3.2	Polissacarídeos de plantas	29
3.2.1	<i>Característica estruturais e funcionais</i>	29
3.2.2	<i>Atividades biológicas</i>	30
3.2.3	<i>Efeitos dos polissacarídeos de <i>Ximenia americana</i> na inflamação</i>	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Desenho Experimental	33
4.2	Material	33
4.2.1	<i>Planta</i>	33
4.2.2	<i>Preparo do chá, extração e isolamento dos polissacarídeos de <i>X. americana</i></i>	33
4.2.3	<i>Fracionamento, caracterização química e estrutural dos polissacarídeos de <i>X. americana</i></i>	34
4.3	Protocolo experimental	34
4.3.1	<i>Animais</i>	34
4.3.2	<i>Tratamento dos animais</i>	35
4.3.3	<i>Modelo de edema de pata</i>	35
4.3.4	<i>Modelo de peritonite</i>	35
4.4	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Caracterização química e estrutural do chá e dos polissacarídeos de <i>X. americana</i>	36

5.2	O chá e as frações polissacarídicas de <i>X. americana</i> inibem o edema de pata induzido por zimosan	37
5.3	FII inibe parâmetros inflamatórios na peritonite induzida por zimosan	38
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	42
	CAPÍTULO II	43
1	INTRODUÇÃO	44
2	OBJETIVOS	46
2.1	Geral	46
2.2	Específicos	46
3	REVISÃO DE LITERATURA	47
3.1	Caracterização anatômica e fisiológica do sistema articular	47
3.1.1	<i>Definição e classificação das estruturas articulares</i>	47
3.1.2	<i>Composição do tecido cartilaginoso</i>	47
3.1.3	<i>Manutenção da cartilagem</i>	50
3.2	Artrite Reumatóide	51
3.2.1	<i>Epidemiologia</i>	51
3.2.2	<i>O processo inflamatório na fisiopatologia da AR</i>	51
3.2.3	<i>Dor Inflamatória na AR</i>	54
3.2.4	<i>Principais mediadores inflamatórios na AR</i>	55
3.2.5	<i>Terapêutica atual versus compostos naturais vegetais</i>	58
3.2.6	<i>Atividades de polissacarídeos de plantas na inflamação articular</i>	59
3.2.7	<i>Polissacarídeos de Ximenia americana</i>	59
3.2.8	<i>Modelo experimental de artrite induzido por zimosan</i>	60
4	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1	Desenho experimental	62
4.2	Material	62
4.2.1	<i>Planta</i>	62
4.2.2	<i>Obtenção do chá de Ximenia americana</i>	62
4.3	Protocolos experimentais	62
4.3.1	<i>Animais</i>	62
4.3.2	<i>Modelo de artrite induzida por zimosan</i>	63

4.3.3	<i>Tratamento dos animais</i>	63
4.3.4	<i>Avaliação da hipernocicepção</i>	63
4.3.5	<i>Avaliação da migração celular</i>	63
4.3.6	<i>Avaliação histopatológica</i>	64
4.4	Análise estatística	64
5	RESULTADOS	65
5.1	O chá de <i>Ximenia americana</i> inibe parâmetros inflamatórios na artrite induzida por zimosan em esquemas de pré e pós-tratamento	65
5.2	Curva dose-resposta do efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> na artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento	66
5.3	Curva de duração do efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> na artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento	67
5.4	FII desproteínada inibe parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento	68
5.5	Comparação do efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> após desproteínização sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento	69
5.6	O chá de <i>X. americana</i> e a fração FII reduzem infiltrado inflamatório, necrose e desorganização na superfície das articulações tíbio-tarsais de ratos com artrite induzida por zimosan	70
5.7	O efeito inibitório do chá de <i>X. americana</i> ocorre via redução de nitrito	73
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	77
	CAPÍTULO III	78
1	INTRODUÇÃO	79
2	OBJETIVOS	82
2.1	Geral	82
2.2	Específicos	82
3	REVISÃO DE LITERATURA	83
3.1	Plantas medicinais e Terapia fitoterápica	83
3.2	Ensaio de toxicidade	85
3.3	<i>Ximenia americana</i>	87

4	MATERIAL E MÉTODOS	88
4.1	Animais	88
4.2	<i>Obtenção do chá de Ximenia americana</i>	88
4.3	Desenho experimental	88
4.4	Avaliação da atividade exploratória	89
4.5	Avaliação da toxicidade do Sistema Nervoso	89
4.6	Avaliação hematológica	90
4.7	Análise histopatológica dos órgãos	90
4.8	Análise de massa relativa dos órgãos e peso corporal	91
4.9	Análise estatística	91
5	RESULTADOS	92
5.1	Avaliação dos sinais de toxicidade	92
5.1.1	<i>Efeito do tratamento com o chá de X. americana na atividade exploratória...</i>	92
5.2	Screening hipocrático de Malone	94
5.2.1	<i>Efeitos do tratamento com o chá de X. americana no Sistema Nervoso Central</i>	94
5.2.2	<i>Efeitos do tratamento com o chá de X. americana no Sistema Nervoso Autônomo</i>	94
5.2.3	<i>Efeitos do tratamento com o chá de X. americana no Sistema Somatossensorial</i>	94
5.3	Análise hematológica	98
5.4	Efeitos do tratamento com o chá de X. americana sobre o peso corporal e massa relativa dos órgãos	99
5.5	Análise histológica dos órgãos	101
5.5.1	<i>Estômago</i>	101
5.5.2	<i>Baço</i>	102
5.5.2	<i>Fígado</i>	103
5.5.4	<i>Rim</i>	104
5.5.5	<i>Cérebro</i>	105
6	DISCUSSÃO	106
7	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110

CAPÍTULO I:

Análise químico-estrutural e efeito anti-inflamatório do chá e dos polissacarídeos de *Ximenia americana L.* sobre parâmetros inflamatórios induzidos por zimosan em camundongos

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório ocorre em resposta à agentes lesivos (substâncias químicas, processos físicos ou microorganismos externos), que são reconhecidos pelo organismo e desencadeiam com prontidão uma resposta do sistema imunológico, modulada por substâncias denominadas mediadores inflamatórios (PEDRAZA-ALVA et al., 2015). Para controlar ou inibir completamente essa condição, são comumente utilizados medicamentos anti-inflamatórios como os glicocorticóides e os AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais). Contudo, o uso prolongado e/ou em altas doses destas substâncias pode causar efeitos adversos gravíssimos, que incluem complicações gastrointestinais e cardíacas, imunossupressão, osteoporose, entre outros (BACCHI et al., 2012; ADCOCK; MUMBY, 2016).

Como forma alternativa ao tratamento com os anti-inflamatórios, pessoas de todo o mundo vem aderindo à Fitoterapia. Os compostos naturais isolados de plantas medicinais têm sido investigados principalmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, permitindo a validação do uso popular e direcionando diversas pesquisas clínicas. Esses compostos podem ser obtidos a partir de várias partes das plantas, como cascas de caules, folhas, frutos, sementes, raízes, e são popularmente utilizados como infusão, maceração, decocção, etc (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Dentre os compostos vegetais, os polissacarídeos apresentam-se como macromoléculas altamente biodisponíveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade (OVODOV, 1998), sendo constituídas por vários monômeros de monossacarídeos, unidos por ligação glicosídicas (DELATTRE et al., 2011). Estudos relatam a grande versatilidade de atividades biológicas de polissacarídeos de plantas, como antitumoral, anti-inflamatória, anticoagulante, anti-diabetes, antiviral, imunomoduladora, dentre outras (XIE et al., 2015; HUANG; MEI; HU, 2017; YU et al., 2018; ZHAO et al., 2020).

Com relação às atividades biológicas de polissacarídeos no processo inflamatório, os extratos metanólicos de *Opuntia ficus indica* apresentaram ação protetora nos modelos de inflamação crônica proliferativa em camundongos (PARK et al., 2001) e deferidas cutâneas (AMMAR et al., 2015). As frações polissacarídicas obtidas das vagens de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e sementes de *Azadirachta indica* (neem) inibiram a migração de leucócitos e mediadores inflamatórios de fase aguda em ratos (PEREIRA et al., 2012a; 2012b). Em processos nociceptivos, os polissacarídeos da fruta *Thladiantha dúbia* reduziram as contorções abdominais induzidas por ácido acético (WANG et al., 2011). Relacionado à

atividade antioxidante, polissacarídeos de várias plantas reduziram os níveis de produtos oriundos da peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e GSH(CHEN et al., 2004; LIU et al., 2011;WANG et al., 2013;MENGOME et al., 2014;LIN et al., 2017; LIU; SUN; HUANG, 2018).

Ximenia americana L. (Olacaceae), popularmente conhecida como ameixa-do-sertão ou ameixa-brava é amplamente distribuída no Nordeste do Brasil (LE et al., 2012), sendo a decocção das cascas, na forma de “chá”, a mais utilizada para tratar condições inflamatórias e dolorosas. Estudos experimentais demonstraram o efeito anti-inflamatório dos extratos hidroetanólicos da casca em modelos de inflamação aguda e crônica (DA SILVA et al., 2018). O extrato aquoso das raízes de *X. americana* reduziu o edema da pata, a migração de neutrófilos e a permeabilidade vascular induzida por carragenana em camundongos (OLABISSI et al., 2011). A atividade antinociceptiva também foi demonstrada na fase inflamatória do teste da formalina (SORO et al., 2009). Os polissacarídeos totais e frações isoladas de *X. americana* apresentaram efeito inibitório em modelos inflamatórios(SILVA-LEITE et al., 2017, 2018).Além disso, o efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos foi demonstrado no modelo de gastrite para o chá de *X. americana*, mesmo material usada no presente estudo (SILVA-PANTOJA et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória do chá e dos polissacarídeos obtidos da casca do caule de *Ximenia americana* em modelos de inflamação aguda induzida por zimosan em camundongos.

2.2 Específicos

- a) Analisar química e estruturalmente o chá e as frações polissacarídicas de *X. americana*.
- b) Avaliar a atividade anti-inflamatória das frações polissacarídicas de *X. americana* administradas por via endovenosa no modelo de edema de pata;
- c) Avaliar a atividade anti-inflamatória e antioxidante das frações polissacarídicas de *X. americana* administradas por via endovenosa no modelo de peritonite, observando-se os parâmetros de infiltrado leucocitário, extravasamento de proteína, estresse oxidativo (malondialdeído) e dor inflamatória;
- d) Avaliar a atividade anti-inflamatória do chá de *X. americana* administradas por via oral no modelo de edema de pata.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais do Processo Inflamatório

A inflamação pode ser caracterizada como um importante mecanismo protetor do organismo, subjacente a uma variedade de processos patológicos e infecciosos. É desencadeada por vários fatores, incluindo agentes biológicos (bactérias, vírus, protozoários), químicos (ácidos, formaldeído, zimosan, etc), físicos (calor e frio excessivos, radiações, traumatismos, etc) e imunes (exposição à antígenos). Tem como objetivo principal a remoção do agente lesivo e o reparo do tecido lesado. Entretanto, a resposta inflamatória não controlada e exacerbada pode levar a múltiplas disfunções do organismo, diversas doenças e alguns tipos de traumas (PEDRAZA-ALVA et al., 2015).

Durante o processo inflamatório, podem ser identificadas duas fases distintas, classificadas quanto à duração e características patológicas. A fase aguda constitui o início do processo, na qual há a atuação do sistema imune inato, apresentando eventos de curta duração e neutrófilos como células predominantes. Além disso, ocorrem importantes alterações vasculares, que permitem o extravasamento de plasma e proteínas plasmáticas, caracterizando a formação de edema, e também a saída dos leucócitos dos vasos para o local da lesão (GOOCH, 2011).

Caso não haja resolução e a resposta persista, o processo evolui para a fase crônica, que apresenta duração mais longa (semanas a meses) e está associada à presença de outros tipos celulares, predominantemente mononucleares, como os linfócitos e os macrófagos. Devido à gravidade da destruição tecidual neste estágio, as tentativas de reparação cursam com os processos de proliferação vascular (angiogênese), fibrose e necrose tecidual. Estes processos são responsáveis por injúria tecidual irreversível, perda de função de órgãos e tecidos e até morte (NASEF; MEHTA; FERGUSON, 2017).

A inflamação é um processo complexo, que se dá com a ocorrência de eventos celulares e vasculares de forma simultânea e relacionados durante todo o curso da resposta. Basicamente ocorrem reações nos vasos sanguíneos, que levam ao acúmulo de fluidos e células sanguíneas no local afetado. Para que tudo isto aconteça, há a atuação indispensável de diversas substâncias solúveis que orquestram e modulam o processo.

3.1.1 Eventos vasculares da Inflamação

O processo inflamatório inicia-se imediatamente após o contato com o agente lesivo e envolve, neste primeiro momento, a microcirculação. Em situações basais, as células e as proteínas migram livremente de acordo com o fluxo da circulação. Entretanto, diante de um estímulo lesivo, a permeabilidade dos vasos é alterada para facilitar a passagem das células sanguíneas (Figura 1).

Primeiramente há uma modificação no calibre dos vasos que dura poucos segundos e caracteriza-se como uma vasoconstrição transitória. Logo em seguida ocorre vasodilatação, estimulada por mediadores inflamatórios de ação majoritariamente vascular como a histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas. O maior aporte de sangue nos vasos dilatados resulta no aumento da pressão hidrostática local, o que permite a transudação de fluidos para o espaço extravascular (SERHAN; SAVILL, 2005).

As alterações da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo modificam a temperatura local, induzindo calor e rubor (importantes sinais clínicos da inflamação aguda). Também estimulam o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício, induzindo a formação de edema, outro parâmetro importante observado nas respostas agudas. Além disso, a saída de proteínas plasmáticas do vaso sanguíneo aumenta a viscosidade do sangue, gerando uma diminuição da circulação e levando ao processo de estase (ALLER et al., 2007).

3.1.2 Eventos celulares da Inflamação

A vasodilatação e a exsudação de proteínas plasmáticas são processos que facilitam a migração de leucócitos para o local da lesão. A migração celular caracteriza-se por ser um evento indispensável à resolução da resposta inflamatória, pois é nesta etapa do processo que ocorre a fagocitose e a degradação dos agentes estranhos causadores da lesão (SUNDERKOTTER et al., 2003).

Os eventos celulares da inflamação ocorrem nos vasos e podem ser divididos em três etapas: a primeira delas envolve amarginação, o rolamento e a adesão firme dos leucócitos ao vaso; a segunda fase é constituída pela transmigração dos leucócitos pelo endotélio, denominada diapedese; e a última fase relaciona-se com a quimiotaxia, ou seja, com migração das células pelos tecidos, estimulados por substâncias quimiotáticas. Aqui, destacam-se substâncias como os fragmentos do sistema do complemento (C3a e C5a), leucotrienos, citocinas, quimiocinas e bioprodutos bacterianos (SMITH, 2008; RIBEIRO et

al., 1991; 1996).

As mudanças dos parâmetros hemodinâmicos vasculares proporcionam a marginação dos leucócitos nas paredes dos vasos. Concomitantemente, as células endoteliais expressam em sua superfície moléculas de adesão nos leucócitos, bem como a secreção de mediadores inflamatórios. O primeiro grupo de moléculas de adesão a atuar na migração celular, especificamente na fase de rolamento, é formado pelas selectinas. Existem três tipos de selectinas, classificadas de acordo com o local onde são produzidas. A selectina E é expressa em células endoteliais em resposta a citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1). A selectina P, sintetizada por megacariócitos e incorporada a plaquetas, também é expressa no endotélio vascular sob a ação de citocinas inflamatórias, trombina e histamina. A selectina L, encontrada constitutivamente na superfície de leucócitos, facilita seu rolamento pelo endotélio e sua saída para os tecidos linfóides periféricos (McEVER, 2010).

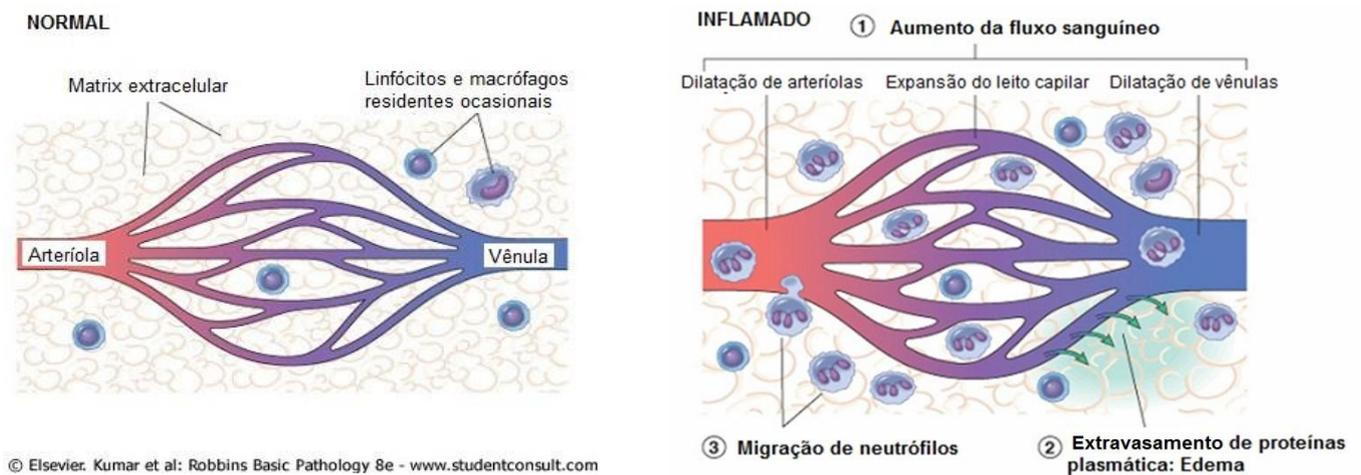
Logo após a fase de rolamento, os leucócitos aderem de maneira firme em um local do vaso que vai proporcionar a sua saída. Este processo é mediado por outras moléculas de adesão, denominadas imunoglobulinas e integrinas, as quais podemos citar as moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão intercelular-2 (ICAM- 2) e molécula de adesão de célula endotelial e plaquetas (PCAM-1). Depois de ligados firmemente ao endotélio, os leucócitos se achatam, para que a área de contato com a superfície vascular seja aumentada e a ligação às moléculas de adesão seja amplificada. Além disso, as células residentes promovem a liberação de outros mediadores, que permitem maior avidéz de ligação entre as moléculas de integrinas e os leucócitos (SMITH, 2008).

Após a adesão firme, finalmente os leucócitos migram em direção ao espaço extravascular, acompanhados pelas proteínas plasmáticas, em um movimento denominado diapedese. No ambiente extravascular, emigram nos tecidos em direção à região de agressão proporcionados pela quimiotaxia, que promove uma locomoção destas células através de um gradiente químico (PETRI; BIXEL, 2006). As substâncias que promovem esse fluxo são os agentes quimiotáticos que podem atrair as células de forma direta, como o leucotrieno B4 (LTB4), C5a, fMLP, interleucina-8 (IL-8); ou indireta, como as citocinas IL- 1 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que agem estimulando células residentes a liberar agentes quimiotáticos diretos (RIBEIRO et al., 1996).

As células residentes localizam-se nos tecidos e incluem macrófagos, mastócitos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais. Na presença de um estímulo agressor, atuam

liberando mediadores químicos e modulam tanto eventos vasculares quanto celulares da inflamação aguda. Desta forma, causam migração de outras células de defesa e amplificam a resposta inflamatória (PEDRAZA-ALVA et al., 2015).

Figura 1. Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.



3.1.3 Dor inflamatória

Além de induzir alterações vasculares e migração de células para o foco lesionado, os mediadores inflamatórios também induzem a ativação ou sensibilização de neurônios, processo que pode proporcionar dor, alodinia ou hiperalgesia ao organismo. A dor pode ser compreendida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável, influenciada em graus variáveis por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Além disso, geralmente está associada a uma lesão real ou potencial (IASP, 2020). A alodinia se refere a um processo induzido por um tipo de estímulo que, em condições normais, não provoca dor. Em contrapartida, a hiperalgesia é uma dor intensa provocada por um estímulo originalmente doloroso (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A dor é um processo sensorial que envolve a integração de vários níveis neurais, compreendendo desde a detecção do estímulo por nociceptores periféricos até o processamento no sistema nervoso central (SNC). Dentre as principais modalidades de dor, a inflamatória está associada à produção e liberação de vários mediadores como citocinas (TNF- α), eicosanóides (prostaglandinas), aminas vasoativas (serotonina, histamina), substância P, que atuam ativando ou desativando os nociceptores, atuando de forma importante na sinalização neural e nas alterações funcionais de neurônios do SNC

(LEUNG; CAHILL, 2010).

3.1.4 Terapia anti-inflamatória

Quando a resposta inflamatória amplificada causa efeitos deletérios ao organismo, impedindo o restabelecimento da homeostase, os medicamentos anti-inflamatórios como os glicocorticoides (do tipo esteroidais) e os AINEs (do tipo não esteroidais) são comumente utilizados com o objetivo de curar ou aliviar os sintomas de inflamação e dor.

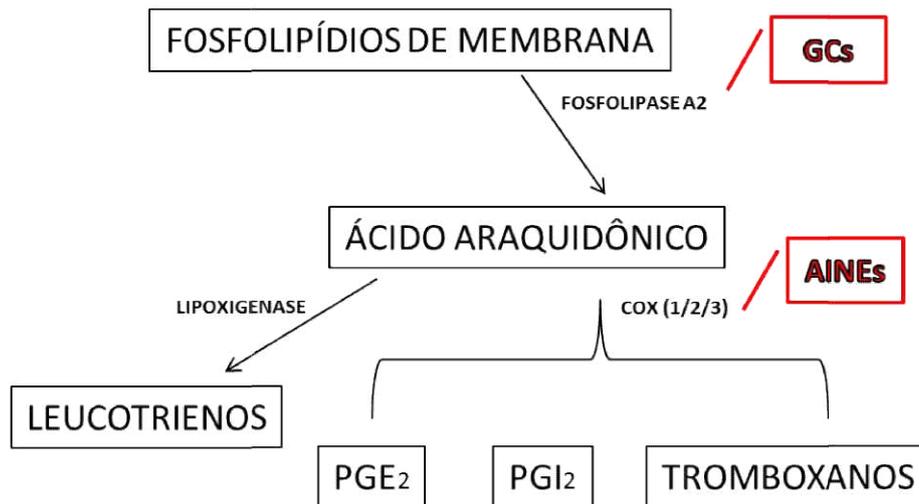
A terapia anti-inflamatória realizada com AINEs é considerada a mais utilizada mundialmente, pois apresenta grande eficácia como agentes analgésicos e anti-inflamatórios. O mecanismo de ação destas substâncias ocorre pela inibição da enzima ciclooxigenase, responsável pela produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, e pode envolver três isoformas (COX 1, COX 2 e COX 3). A COX 1 é a forma constitutiva, uma vez que está presente nas mucosas do organismo e tem função de proteção, enquanto a COX 2 é altamente expressa durante o processo inflamatório (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). A limitação do uso prolongado dos AINEs se resume na possibilidade de seus graves efeitos colaterais principalmente sobre o trato gastrointestinal, uma vez que inibem não só a isoforma COX 2, mas também a COX 1. O efeito supressor sobre a enzima constitutiva pode resultar, além das ulcerações e hemorragias gástricas, em alterações cardiovasculares e renais (SOSTRES, 2010; BACCHI et al., 2012).

Os glicocorticóides (GCs), ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são utilizados como tratamento para vários distúrbios inflamatórios, autoimunes e alérgicos há décadas. São medicamentos que possuem ação mais ampla que os AINEs, pois agem no início da cascata inflamatória (Figura 2), bloqueando a enzima fosfolipase A2 e impedindo a formação do ácido araquidônico, substrato importante das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase. A ausência da enzima lipoxigenase impede a formação dos leucotrienos, um dos principais agentes quimiotáticos para neutrófilos. Apesar da eficácia, os GCs também podem causar vários efeitos adversos devido ao uso prolongado e/ou em doses elevadas, que estão relacionados principalmente à imunossupressão. Além disso, também podem causar efeitos gástricos e problemas ósseos, entre outros (ADCOCK; MUMBY, 2016).

Apesar da eficácia comprovada das terapias anti-inflamatórias, a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos diminuiu, em muitos casos, as vantagens de suas utilizações. Este cenário tem estimulado a busca constante por novas alternativas terapêuticas, que

tragam menos efeitos indesejados, e as buscas têm se concentrado bastante nos produtos naturais de origem vegetal.

Figura 2. Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios.



Fonte: Autoria própria

3.2 Polissacarídeos de plantas

3.2.1 Características estruturais e funcionais

Os carboidratos são as macromoléculas mais abundantes na natureza e apresentam grande importância para as células vegetais, visto serem os principais componentes de suas paredes celulares (AVIGAD; DEY, 1997). Os polissacarídeos são carboidratos constituídos por dez ou mais unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo entre si na unidade, no grau de ramificação, no tipo de ligação e no comprimento de suas cadeias, apresentando diferentes composições e funções (LEHNINGER, 2006).

A parede celular vegetal é uma estrutura altamente organizada, composta de variados polissacarídeos, além de proteínas e substâncias aromáticas. Dentre estes, a celulose é o polissacarídeo mais abundante, compreendendo aproximadamente 30-60% da parede celular das gimnospermas e aproximadamente 60-65% da parede celular das angiospermas (BeMILLER, 2001a). A estrutura de polissacarídeos de parede celular consiste de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-manose, D-

galactose), ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, ácido D-4-O-metil-glucurônico) e desoxi-hexoses (L-ramnose, L-fucose) (WALDRON; FAULDS, 2007).

A celulose é um polímero de glicose rígido e linear, com ligações B-(1→4). As hemiceluloses são variações de celulose, compondo cerca de 15-35% da parede celular, embora o percentual possa exceder 40% em algumas espécies de angiospermas (BeMILLER, 2001a). Consistem de polissacarídeos associados à celulose, onde há uma cadeia principal de glucose, xilose ou manose, e ramificações com arabinose, xilose, galactose, fucose ou ácido glucurônico (BeMILLER, 2001b; FRY, 2001). Estes polissacarídeos constituem importante função estrutural na célula vegetal.

A rede de microfibrilas formada pela associação entre celulose e hemicelulose, está inserida em uma matriz de pectinas, polissacarídeos carregados negativamente, que correspondem 1 a 4% da parede celular (DAVIES, 2001). As microfibrilas de celulose são sintetizadas por grandes complexos hexaméricos na membrana plasmática, enquanto hemiceluloses e pectinas, que compõem a matriz polissacarídica, são sintetizadas no complexo de Golgi, sendo depositadas na superfície da parede por vesículas (COSGROVE, 2005).

3.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos de plantas

Pessoas de todo o mundo vêm aderindo à Fitoterapia como uma forma alternativa de tratamento dos processos inflamatórios e dolorosos. Compostos naturais isolados de plantas medicinais têm sido investigados devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, permitindo a validação do uso popular e direcionando diversas pesquisas clínicas. Esses compostos podem ser obtidos a partir de várias partes das plantas, como cascas de caules, folhas, frutos, sementes, raízes, e são popularmente utilizados como infusão, maceração, decocção, etc (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Entre os compostos vegetais, os polissacarídeos apresentam-se como moléculas altamente biodisponíveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade (OVODOV, 1998). Estão entre as macromoléculas mais importantes da família dos biopolímeros, sendo constituídos por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas (DELATTRE et al., 2011). Apresentam grande versatilidade em suas atividades biológicas, incluindo-se antitumoral, imunomoduladora, antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, dentre outras (XIE et al., 2015; YATOO et al., 2018). Diante desta vasta gama de ações, os polissacarídeos de

plantas têm se mostrado bastante promissores quanto ao seu papel na saúde humana e têm sido alvo de vários estudos científicos.

Com relação às atividades biológicas de polissacarídeos no processo inflamatório, os extratos metanólicos de *Opuntia ficus indica* apresentam ação protetora nos modelos de inflamação crônica proliferativa em camundongos (PARK et al., 2001) e feridas cutâneas (AMMAR et al., 2015). As frações polissacarídicas obtidas das vagens de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e sementes de *Azadirachta indica* (neem) inibem a migração de leucócitos e mediadores inflamatórios de fase aguda em ratos (PEREIRA et al., 2012a; 2012b). Em processos nociceptivos, os polissacarídeos da fruta *Thladiantha dúbia* reduzem as contorções abdominais induzidas por ácido acético (WANG et al., 2011). Relacionado à atividade antioxidante, polissacarídeos de várias plantas reduzem os níveis de produtos oriundos da peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e glutatona reduzida (GSH) (WANG et al., 2013; LI; SUN; HUANG, 2018).

3.2.3 Efeitos dos polissacarídeos de *Ximenia americana* na inflamação

A planta medicinal *Ximenia americana* L. (Olacaceae), amplamente distribuída no Nordeste brasileiro, é conhecida popularmente como ameixa-do-sertão ou ameixa-brava (LE et al., 2012). Possui vasta utilização pela população, sendo empregada em tratamentos de condições que envolvem inflamação e dor, e consumida na forma de “chá”, preparado por decocção das cascas do caule.

Estudos experimentais demonstraram o efeito anti-edematogênico dos extratos hidroetanólicos das cascas de *X. americana* em modelos de inflamação aguda e crônica (DA SILVA et al., 2018). O extrato aquoso de suas raízes inibe o edema da pata, a migração de neutrófilos e a permeabilidade vascular induzidos por carragenina em camundongos (OLABISSI et al., 2011). O extrato aquoso da casca do caule mostrou atividade antinociceptiva na fase inflamatória do teste da formalina (SORO et al., 2009). Os polissacarídeos totais e frações isoladas de suas cascas inibem parâmetros de inflamação e dor, incluindo a melhora do quadro de pancreatite experimental (SILVA-LEITE et al., 2017, 2018). Além disso, o efeito inibitório na migração de neutrófilos foi demonstrado no modelo de gastrite para o chá de *X. americana*, preparado da forma utilizada no presente estudo (SILVA-PANTOJA et al., 2018).

Figura 3. *Ximenea americana* L.



Fonte: Arquivo próprio

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

As atividades anti-inflamatórias e anti-hipernociceptivas do chá e das frações polissacarídicas das cascas do caule de *Ximenia americana* foram avaliadas após a administração do agente flogístico zimosan nas patas ou no peritônio de camundongos. Em seguida, foram feitas as análises dos seguintes parâmetros: edema, extravasamento de proteína, infiltrado leucocitário, estresse oxidativo (malondialdeído) e hiperalgesia. Os animais do grupo controle receberam salina estéril pelas vias subcutânea (s.c.) nas patas ou intraperitoneal (i.p.).

4.2 Material

4.2.1 Planta

As cascas de *Ximenia americana* (Olacaceae) foram coletadas no município de Custódio (Quixadá-CE) e a exsiccata da planta encontra-se depositada na FECLESC/Quixadá e no Herbário Prisco Bezerra - UFC (nº 46794). A atividade de avaliação foi registrada no Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e dos Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN - A8B2C79), de acordo com a Lei Federal nº 13123/2015.

4.2.2 Preparo do chá, extração e isolamento dos polissacarídeos de *X. americana*

O chá foi obtido por decoção das cascas do caule de *X. americana* em água destilada (100°C/5 min) e liofilização, antes de ser utilizado nos protocolos experimentais (SILVA-PANTOJA et al., 2018).

Para a extração e isolamento dos polissacarídeos, as cascas foram lavadas, secas (400°C) e maceradas em pó (5 g), suspensas em metanol (1:50, p/v), homogeneizadas (76 °C, 2 h) e filtradas (2x). À porção insolúvel foi adicionado NaOH 0,1 M (97 °C, 2 h), que foi filtrada e centrifugada (2496 g, 15 min, 25 ° C). Os sobrenadantes foram neutralizados (HCl 1M), precipitados em etanol e centrifugados nas condições anteriores. O precipitado final foi dialisado, centrifugado e o sobrenadante liofilizado denominado PLT, o qual foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA) durante 4 h em banho de gelo (4 ° C) até atingir pH 2,0 ou

3,0. O precipitado de proteína foi separado por centrifugação (2.496 g, 30 min, 25 ° C) e o sobrenadante dialisado e liofilizado para se obter o PLT-Xa desproteinado (ZHAO et al., 2014).

4.2.3 Fracionamento, caracterização química e estrutural do chá e dos polissacarídeos de *X. americana*

- *Fracionamento do chá e dos polissacarídeos*: os PLT foram dissolvidos em água destilada (1:2, p/v) e aplicados em coluna cromatográfica (9,8 x 1,0 cm) contendo resina de troca iônica (DEAE-celulose), equilibrada e lavada com água destilada e eluída (60 mL/h) com NaCl (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 M).

- *Análises químicas do chá e dos polissacarídeos*: As análises químicas do chá e das frações polissacarídicas majoritárias foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e reação de carbazol (DISCHE, 1947) para hexoses e ácido hexurônico, respectivamente. A presença de pigmentos e/ou proteínas, nas frações cromatográficas, foi observada pela leitura em absorvância a 280 nm. Os teores de proteínas foram analisados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e os de compostos polifenólicos de acordo com a metodologia descrita por SIDDIQUI et al., 2017, utilizando padrões de albumina sérica bovina e ácido gálico, respectivamente.

- *Caracterização estrutural do chá*: O chá de *X. americana* foi analisado por espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Para tanto, amostras (2 mg) foram misturadas com brometo de potássio em pó e prensadas em disco na região do infravermelho médio a 500-4000 cm⁻¹, com resolução de 3 cm⁻¹ (Perkin Elmer Spectrum 100, EUA).

4.3 Protocolos experimentais

4.3.1 Animais

Camundongos Swiss albinos (25-35 g) foram mantidos com livre acesso a comida e água, em condições ambientais controladas (12/12 h de ciclo claro/escuro, temperatura de 25 ° C). Todos os protocolos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE nº: 4153018/2018).

4.3.2 Tratamento de animais

O chá das cascas de *X. americana* (50, 100, 150 mg/kg) foi administrado por via oral (v.o.) e as frações polissacarídicas FI (0,1 M) e FII (0,25 M), por via endovenosa (1 mg/kg; e.v.) 1 h antes da indução do edema ou da peritonite com zimosan.

4.3.3 Modelo de edema da pata

O edema da pata foi induzido com zimosan, na pata traseira do animal por via subcutânea (500 µg; s.c.) e medido por hidropletismometria antes da indução (tempo zero) e em intervalos de tempo selecionados posteriormente (0,5; 1 - 5 h). Os animais controle receberam solução de salina estéril (NaCl 0,9%) na pata contralateral (0,1 ml/10 g de massa corporal; s.c.). Os resultados foram expressos como a variação no volume da pata (µl) ou área sob a curva dose-efeito (ASC) (LANDUCCI et al., 1995).

4.3.4 Modelo de peritonite

Zimosan (500 µg/cavidade) foi administrado 4 h antes da avaliação da hipernocicepção. Imediatamente a avaliação da dor, os animais foram eutanasiados para a coleta do fluido peritoneal com 3 ml de salina heparinizada (5 UI) para contagem total e diferencial de leucócitos (neutrófilos e células mononucleares), quantificação de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e de malondialdeído (MDA – TBARS) (HUONG et al., 1998).

Para avaliação da hipernocicepção visceral, os camundongos foram colocados em caixa individual de acrílico transparente 15 min antes do teste de adaptação ao ambiente. O limiar nociceptivo dos animais foi avaliado por meio da aplicação de pressão gradual (g) no abdômen, com ponteira de polipropileno, acoplada a um transdutor de força manual (Anestesiômetro Eletrônico Von Frey; Insight). A hipernocicepção também foi avaliada antes da indução da peritonite (tempo zero) (LE BARS et al., 2001).

4.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± EPM. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização química e estrutural do chá e dos polissacarídeos de *X. americana*

O chá preparado por decocção das cascas de *X. americana* mostrou rendimento de 1,8%, apresentando como constituintes majoritários carboidratos (44,8%, incluindo 10,4% ácido urônico) e polifenóis (28,3%). Além disso, apresentou baixo teor de proteínas (1,34%). O PLT-Xa, extraído das cascas de *X. americana* por uma combinação de solução alcalina leve seguida de precipitação com etanol, após aplicação em coluna de DEA- Celulose, resultou em duas principais frações polissacarídicas parcialmente desproteïnadas (FI e FII), com teores de carboidratos semelhantes ao do chá, principalmente FII (PLT-Xa: 43%; FI: 25%; FII: 44%). Entretanto, as frações apresentaram diferentes teores de ácido urônico (PLT-Xa: 5,2 %; FI: 9,8%; FII:25%) e de proteínas (TPL-Xa: 0,6%; FI: 0,9%; FII: 0,8%). Ressalta-se também uma diminuição relevante no teor de polifenóis (TPL-Xa: 4,64; FI: 0,78; FII: 1,50 GAE) em comparação ao chá. Além disso, a relação ácidourônico/hexoses (0,56) foi maior para FII (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento e análise química do chá e das frações polissacarídicas de *X. americana*

Amostra	Rendimento (%)	^a Carboidratos (%)	^b Ácido urônico (%)	^c Ácido urônico/Hexoses	^d Polifenóis (GAE)	^e Proteínas (%)
Chá	1.8	44.8	10.4	0.23	28.3	1.34
FI	9.0	25.0	9.8	0.39	0.78	0.9
FII	34.0	44.4	25.0	0.56	1.50	0.8

^aDubois et al., 1956; ^bDische, 1947; ^cRazão molar; ^dSiddiqui et al., 2017 ^eBradford, 1976

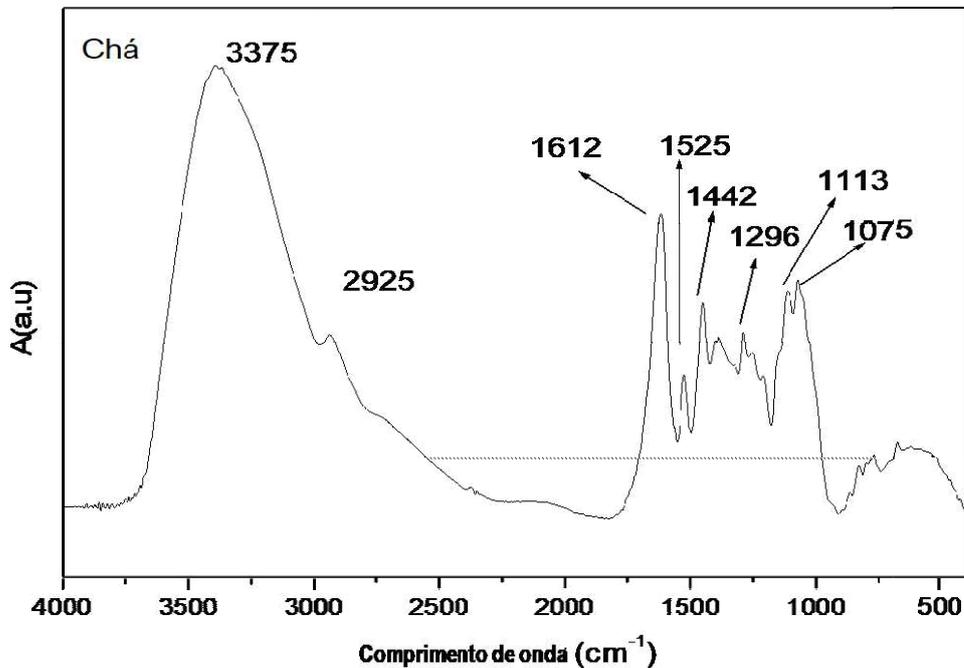
GAE: equivalente de ácido gálico (mg/g). Rendimento: a partir de 5 g de pó seco das cascas de *X. americana*.

Os espectros de FTIR obtidos do chá *X. americana* revelaram picos de absorção em torno de 3375 cm⁻¹ e 2925 cm⁻¹, correspondentes ao alongamento de O-H e C-H, respectivamente (SUN et al., 2009). Picos em 1442 cm⁻¹, 1525 cm⁻¹ e 1612 cm⁻¹ também foram detectados, indicando a presença de ácido urônico (grupo COOH) (LI et al., 2014). Regiões de absorção entre 1500 e 700 cm⁻¹ correspondem à faixa de carboidratos (KARNIK et al., 2016), em que o pico em 1113 cm⁻¹ caracteriza as ligações glicosídicas (XU et al., 2016).

O pico observado em 1442 cm⁻¹ foi atribuído ao alongamento do grupo C=O de anéis aromáticos, típico de compostos fenólicos e o pico em 1296 cm⁻¹ para ligações CO, que

correspondem a flavonóides (BAGHERI et al., 2013) (Figura 4).

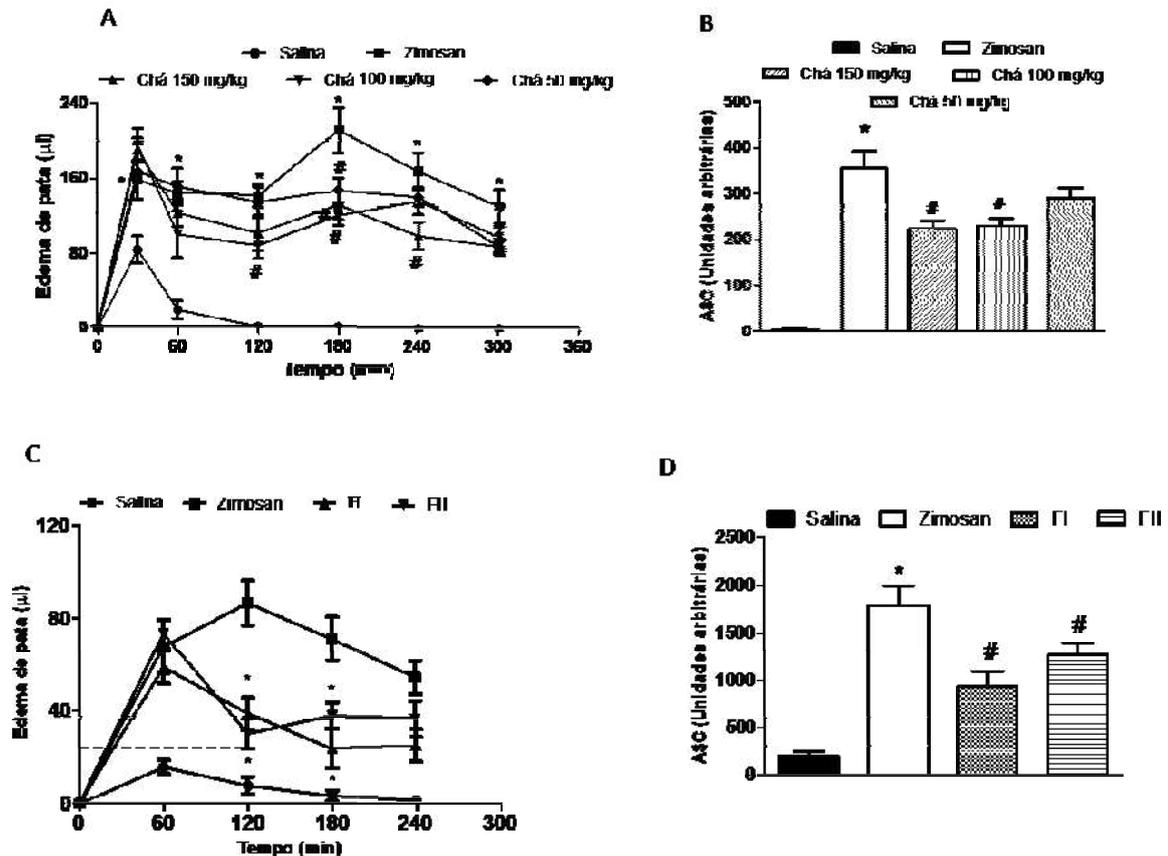
Figura 4. Análise do chá de *X. americana* por espectroscopia de infravermelho (FTIR). A região espectral examinada foi de 500 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 3 cm^{-1} .



5.2 O chá e as frações polissacarídicas de *X. Americana* inibem o edema de pata induzido por zimosan

A injeção subcutânea intraplantar de zimosan (500 μg) induziu edema de pata nos animais, que atingiu efeito máximo após 3 h ($211,4 \pm 24,1 \mu\text{l}$ vs. salina: $2,5 \pm 2,5 \mu\text{l}$), e foi mantido até 5 h. O tratamento dos animais com o chá de *X. americana* apresentou atividade de inibição do edema, com efeito máximo 3 h após indução, em 43% (100 mg/kg: $120,0 \pm 10,2 \mu\text{l}$) e 40% (150 mg/kg: $131,4 \pm 15,3 \mu\text{l}$) (Figura 5A). O cálculo da área sob a curva dose-resposta (2-4 h) revelou que o chá, nas doses de 150 mg/kg e 100 mg/kg, reduziu o edema induzido por zimosan ($355,0 \pm 38,1 \text{ASC}$ vs. salina: $4,2 \pm 4,2 \text{ASC}$) em 38% ($222,5 \pm 18,7 \text{ASC}$) e 36% ($229,2 \pm 15,6 \text{ASC}$), respectivamente (Figura 5B). As frações polissacarídicas FI e FII (1 mg/kg) reduziram o edema após 2 h de indução em 55% ($38,7 \pm 6,9 \mu\text{l}$ vs. zimosan: $86,6 \pm 9,5 \mu\text{l}$) e 65% ($30,0 \pm 6,6 \mu\text{l}$ vs. zimosan: $86,6 \pm 9,5 \mu\text{l}$), respectivamente (Figura 5C). A área sob a curva mostrou que FI e FII reduziram o edema em 47% ($933,8 \pm 158,1 \text{ASC}$) e 30% ($1263 \pm 124,8 \text{ASC}$), respectivamente (Figura 5D).

Figura 5. Efeito inibitório do chá e das frações polissacarídicas (FI e FII) de *X. americana* sobre o edema de pata induzido por zimosan. (A) Os camundongos foram tratados com o chá (50, 100, 150 mg/kg; p.o.) ou (C) FI e FII (1 mg/kg; e.v.) 1 h após o zimosan (500 µg/pata, s.c); os animais controle receberam solução salina. O edema foi avaliado por hidropletismometria após (1-5 h) e antes do tratamento. (B, D) Área sob a curva. Média ± EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni * p <0,05 vs. salina #p <0,05 vs. zimosan.



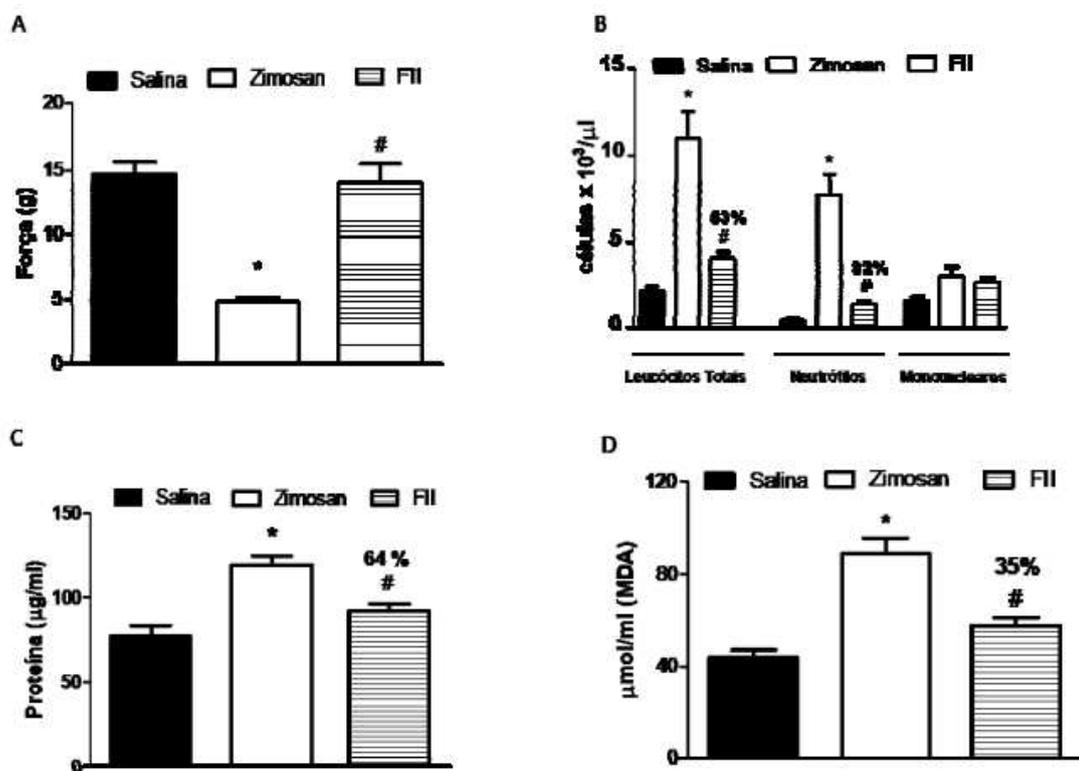
5.3 FII inibe parâmetros inflamatórios na peritonite induzida por zimosan

O zimosan i.p. (500 µg) induziu hipernociceção em camundongos, observado pelo comportamento de retirada do abdômen em resposta à pressão aplicada, o que reduziu o limiar nociceptivo dos animais em comparação ao grupo controle (zimosan: $4,7 \pm 0,3$ g vs. salina: $14,7 \pm 0,9$ g). O tratamento endovenoso com FII aumentou em 66% o limiar nociceptivo dos animais, restaurando-o para valores próximos aos obtidos nos animais controles injetados com salina (FII: $13,87 \pm 1,59$) (Figura 6A).

O zimosan i.p. (500 µg) também estimulou a migração de leucócitos, aumentando em 5 vezes o número de leucócitos totais/µl no peritônio dos animais (10979 ± 1475 células/µl vs. salina: $2.106 \pm 266,7$ células/µl). O tratamento com FII reduziu em 63% o número total de leucócitos ($3993 \pm 439,1$ células/µl), causada principalmente pela

inibição de neutrófilos, em 82% ($1350 \pm 238,9$ vs. zimosan: $7773,2 \pm 1191$ células/ μl) (Figura 6B). Além disso, FII diminuiu os níveis de proteínas plasmáticas em 64% ($92,6 \pm 4,5$ vs. zimosan: $119,6 \pm 5,4$ $\mu\text{g/ml}$) (Figura 6C) e de MDA em 63% ($57,5 \pm 3,5$ vs. zimosan: $88,9 \pm 6,3$ g/ml) (Figura 6D).

Figura 6. Efeito inibitório da fração polissacarídica FII de *X. americana* sobre parâmetros inflamatórios induzidos por zimosan no modelo de peritonite. Camundongos foram tratados com FII (1 mg/kg; e.v.) 1 h após zimosan (500 $\mu\text{g/cavidade}$, i.p.); os animais controle receberam solução salina. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados no líquido peritoneal 4 h após os estímulos: (A) Hipernocicepção abdominal; (B) Leucócitos totais e diferenciais; dosagens de (C) Proteína e (D) MDA. Média \pm EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni * p < 0,05 vs. salina. #p < 0,05 vs. zimosan.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a obtenção e caracterização química do chá e das frações polissacarídicas desproteïnadas obtidos das cascas do caule de *Ximenia americana*, juntamente com sua atividade anti-inflamatória em modelos de edema de pata e peritonite induzidos por zimosan em camundongos.

O chá apresentou alto teor de carboidratos totais e polifenóis, além de baixo teor de proteínas. Estudos anteriores já haviam demonstrado esse padrão em chás e frações de polissacarídeos obtidas de plantas (ZHU et al., 2019, YANG et al., 2018, CHEN et al., 2018).

O PLT-Xa e a fração FII de *X. americana* apresentaram um teor de carboidratos semelhante ao do chá, contudo foram diferentes quanto aos teores de ácido urônico. A fração FII mostrou-se superior na relação ácido urônico/hexoses, mas apresentou níveis substancialmente menores de polifenóis, quando comparados ao chá. É bem relatado na literatura que frações de polissacarídeos de várias plantas apresentam composição química semelhante em comparação as decocções (CHEN et al., 2016).

Os espectros de FT-IR obtidos do chá das cascas de *X. americana* revelaram picos relacionados à faixa de ligações referentes à presença de carboidratos, ácido urônico (grupo COOH), compostos fenólicos e flavonóides (SUN et al., 2009; KARNIK et al., 2016; LI et al., 2014; BAGHERI et al., 2013). Nossos dados reforçam a sugestão de que, apesar dos diferentes métodos de extração utilizados nos trabalhos referidos, o teor de carboidratos totais não muda significativamente. Essas faixas de absorção encontradas no nosso trabalho corroboram os resultados encontrados nos espectros de FT-IR da fração FII extraída das cascas de *X. americana*, a mesma utilizada em nosso estudo, previamente publicada pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA-LEITE et al., 2017).

O tratamento dos animais com o chá (v.o.) e com as frações polissacarídicas (e.v.) de *X. americana* inibiu o edema de pata induzido por zimosan. O zimosan é um polissacarídeo da parede celular de levedura que induz uma resposta inflamatória envolvendo edema dose e tempo dependente e infiltrado leucocitário intenso (SUO et al., 2014). Estudos mostraram o efeito anti-inflamatório de extratos polissacarídicos de plantas, como os de *C. ferrea*, *A. indica* (PEREIRA et al., 2012a; 2012b), de *Ximenia americana* (extrato aquoso etanólico das raízes) (OLABISSI et al., 2011), e de *Sargentodoxa cuneata* (GUO et al., 2018) no modelo de edema de pata induzido por carragenana, que também apresenta os mesmos padrões inflamatórios de extravasamento protéico e intenso infiltrado leucocitário que o edema induzido por zimosan (DiROSA et al., 1971).

O zimosan, administrado no peritônio, induz inflamação aguda caracterizada por infiltrado leucocitário intenso, aumento da permeabilidade vascular, hipernocicepção e liberação de mediadores inflamatórios (LEITE et al., 2015). O tratamento dos animais com FII reduziu a migração de neutrófilos e a permeabilidade vascular, evidenciada pela diminuição do extravasamento de proteínas, e também aumentou o limiar nociceptivo abdominal, apresentando ação significativa na dor inflamatória. Em estudos anteriores, resultados semelhantes foram relatados para outros polissacarídeos de plantas (PEREIRA et al., 2012a; 2012b; WANG et al., 2011; OLABISSI et al., 2011; SILVA-LEITE et al., 2017).

Além disso, nossos resultados mostraram que a fração polissacarídica FII reduziu os níveis de MDA no fluido peritoneal de animais estimulados com zimosan. O malondialdeído é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, sendo, portanto, um importante determinante do estresse oxidativo em situações clínicas, como a inflamação (GIERA et al., 2012). Trabalhos anteriores descreveram a capacidade dos polissacarídeos de plantas na eliminação de radicais livres, configurando a atividade antioxidante (CHEN et al., 2004; LIU et al., 2011; WANG et al., 2013; MENGOME et al., 2014; LIN et al., 2017; LIU; SUN; HUANG, 2018; GUO et al., 2018).

A análise química revelou alto teor de carboidratos na composição do chá e das frações polissacarídicas, principalmente da fração FII, o que leva a suposição de que tanto o efeito antiinflamatório do chá e das frações quanto o efeito antioxidante de FII podem ser atribuídos aos polissacarídeos presentes nas amostras estudadas. Além disso, o chá também apresenta considerável teor de polifenóis, substância bem descrita na literatura por suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (XU et al., 2017).

7 CONCLUSÃO

Diante destes resultados pode-se concluir que as frações polissacarídicas e o chá obtido das cascas do caule de *Ximenia americana* apresentam efeito anti-inflamatório em camundongos nos modelos de edema de pata e peritonite induzidos por zimosan por meio de reduções nos parâmetros edema, exsudação protéica, migração de neutrófilos e dor inflamatória. Esses efeitos podem validar o uso popular do chá *X. americana* como anti-inflamatório.

CAPÍTULO II:

Efeito anti-inflamatório do chá e dos polissacarídeos das cascas de *Ximenia americana* na artrite experimental induzida por zimosan: papel modulador de polissacarídeos

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que de 0,5 a 1% da população mundial adulta tenha sido diagnosticada portadora de artrite reumatóide (AR), incluindo 1,8 milhões de brasileiros (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2013). A doença afeta com maior incidência pessoas do sexo feminino, entre 30 e 50 anos (CROWSON et al., 2011). Possui causa desconhecida e prognóstico complicado na maioria dos casos, além do custo do tratamento, que inclui elevadas despesas médicas e hospitalares. Além disso, envolve perda de produtividade pessoal e invalidez, o que pode trazer sérios danos à qualidade de vida das pessoas e considerável impacto socioeconômico.

A AR é uma doença inflamatória sistêmica que está associada a danos progressivos e irreversíveis nas articulações periféricas. Inicialmente, o quadro se inicia com eventos imunológicos que evolui para sinovite hiperplásica (*pannus* reumatóide) e dor articular. A progressão da doença depende da atividade de células mononucleares como os linfócitos B e macrófagos, que liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (MORADI et al., 2014; ANIC; MAYER, 2014; SIOUTI; ANDREAKOS, 2019). Os neutrófilos são

células-chave na inflamação articular, atuando durante toda a resposta imune. São responsáveis pela liberação de enzimas proteolíticas, indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de células inflamatórias residentes. Desta forma, regulam tanto as fases aguda como a crônica (CECCHI et al., 2018; STAMP et al., 2012). Destaca-se também a atuação dos linfócitos T na progressão inflamatória da AR, liberando citocinas inflamatórias envolvidas na migração celular e na destruição óssea, além de ativação de outras células como macrófagos, linfócitos B (na produção de anticorpos), fibroblastos e células epiteliais (VEALLE; ORR; FEARON, 2017).

A terapêutica medicamentosa para o controle e alívio dos sintomas da AR envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticóides e medicamentos modificadores do curso da doença (DMARDs) (SMOLEN et al., 2016, 2017; TANAKA, 2013; BURMESTER; POPE, 2017). Estes, apesar da eficácia comprovada, produzem efeitos colaterais graves que restringem seu uso à longo prazo, tais como hipertensão, hiperglicemia, imunossupressão, transtornos gastrointestinais e cardiovasculares, dentre outros (MÖLLER et al., 2015).

Princípios ativos isolados de plantas medicinais com propriedades anti-inflamatória e analgésica vêm sendo amplamente estudados pelo seu potencial no tratamento

de doenças, como a artrite (DRAGOS et al., 2017). Vários estudos focados no processo inflamatório articular relatam os efeitos promissores de substâncias purificadas ou extratos de origem vegetal. A curcumina, administrada oralmente, e a quercetina, administrada por via subcutânea, diminuíram o infiltrado leucocitário e a produção de mediadores inflamatórios nas membranas sinoviais de ratos (NONOSE et al., 2014; GUAZELLI et al., 2018). Os extratos hidroetanólico e etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-vermelha) e *Eryobotrica japonica*, respectivamente também inibiram a migração celular na articulação e, esta última, a dor inflamatória induzida por zimosan (ROSAS et al., 2015; KURAOKA-OLIVEIRA et al., 2019). Além destes, o extrato aquoso das folhas de *Libidibia ferrea*, rico em polifenóis, apresentou atividade anti-oxidante e anti- inflamatória na inflamação articular em joelho de ratos, induzida por zimosan em ratos (FALCÃO et al., 2019).

Os polissacarídeos são constituintes vegetais de fácil obtenção, ampla biodisponibilidade e baixa ou nenhuma toxicidade (OVODOV, 1998). Nos processos inflamatórios articulares, a galactomanana extraída de *Cyamopsis tetragonolobus* inibe a dor da osteoartrite experimental (CASTRO et al., 2007); e a glucoronoxilomanana isolada da levedura *Cryptococcus neoformans* reduz a severidade da artrite reumatóide em roedores (MONARI et al., 2009). Polissacarídeos isolados da planta *Angelica sinensis* também diminuíram a atividade oxidante em lesão de osteoartrite de condrócitos humanos isolados (ZHUANG et al., 2018). Com relação aos extratos brutos de plantas, o tratamento oral de ratos com o chá das folhas de *Camellia sinensis* (chá preto indiano) reduziu a peroxidação lipídica no tecido articular, em modelo de poliartrite induzida por adjuvante de Freund (ROY et al., 2008).

Ximenia americana L. (ameixa-do-sertão) é amplamente distribuída no Nordeste brasileiro e utilizada na forma de decocção (“chá”) das cascas do caule para tratar processos inflamatórios e dolorosos (SOUZA et al., 2014). Experimentalmente, demonstrou-se que extratos hidroetanólicos, aquosos e frações polissacarídicas obtidos das cascas apresentam propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas (SORO et al., 2009; OLABISSI et al., 2011; da SILVA et al., 2018; SILVA-LEITE et al., 2017; 2018, MARQUES et al., 2020). Mais recentemente, foi demonstrado o efeito inibitório do chá das cascas de *X. americana* sobre a migração de neutrófilos em modelo de gastrite (SILVA-PANTOJA et al., 2018) e de inflamação aguda induzida por zimosan em camundongos (MARQUES et al., 2020). Apesar disso, estudos envolvendo os efeitos e os mecanismos da ação desta planta em modelo de artrite experimental são inexistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos anti-inflamatório e analgésico do chá e dos polissacarídeos extraídos a partir das cascas de *Ximenia americana*, no modelo de artrite induzida por zimosan na articulação tíbio-tarsal de ratos.

2.2 Específicos

- a) Avaliar a atividade anti-inflamatória do chá de *X. americana* administrado por via oral, em esquema de pré e pós tratamento, no modelo de artrite tíbio-tarsal induzida por zimosan;
- b) Avaliar a atividade anti-inflamatória da fração polissacarídica FII de *X. americana* administrado por via endovenosa no modelo de artrite tíbio-tarsal induzida por zimosan;
- c) Avaliar a atividade anti-inflamatória do chá e da fração FII sob parâmetros histo- e imunohistológico nas articulações;
- d) Avaliar a duração do efeito anti-inflamatório do chá de *X. americana* administrado por via oral;
- e) Avaliar a participação do óxido nítrico no efeito do chá e dos polissacarídeos de *X. americana*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caracterização anatômica e fisiológica do sistema articular

3.1.1 Definição e classificação das estruturas articulares

As articulações (ou juntas) são estruturas que compõem o sistema articular e podem ser definidas como regiões de conexão entre dois ou mais ossos e cartilagens. A principal função desse sistema é permitir a movimentação do esqueleto nas contrações musculares sem o desgaste dos ossos, além de mantê-los unidos, garantindo estabilidade e postura ao corpo humano, mesmo após o crescimento ósseo (ARCHER et al., 1999).

Com relação à composição, as articulações podem ser classificadas em fibrosas, cartilaginosas e sinoviais. A articulação fibrosa é constituída basicamente de tecido conjuntivo e tem importante papel na absorção dos choques e atritos, sendo considerada imóvel. Pode ser do tipo sutura, que são aquelas encontradas nos ossos do crânio, e sindesmose, entre a tibia e a fíbula. A articulação cartilaginosa consiste de tecido cartilaginoso hialino (sincondroses) ou fibroso (sínfises) entre as estruturas ósseas. São semi-móveis, portanto apresentam pouco movimento (ARCHER et al., 1999; HUNZIKER; QUINN; HAUSELMANN; 2002).

Há ainda a articulação do tipo sinovial, objeto de estudo deste trabalho, que se caracteriza por ser móvel devido à presença de líquido, denominado sinóvia ou líquido sinovial, na cápsula articular, estrutura importante na união dos ossos, cartilagens e ligamentos. Podem ainda ser classificadas em uniaxiais, quando possuem apenas um eixo de rotação; biaxiais, com dois eixos de rotação e poliaxiais, com três eixos de rotação. Esses eixos são importantes porque possibilitam os mais diversos movimentos corporais, como os de abdução, adução, flexão, extensão, rotação, pronação, etc. Além do líquido sinovial, estas articulações possuem outras estruturas básicas denominadas cavidade e cartilagem articular (DECKER; KOYAMA; PACIFICI, 2014).

3.1.2 Composição do tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso das articulações sinoviais é composto por um número de condrócitos totais reduzido (1-2% do volume total) e uma extensa matriz extracelular, composta predominantemente de fibras colágenas, proteoglicanos (agrecano), proteínas não

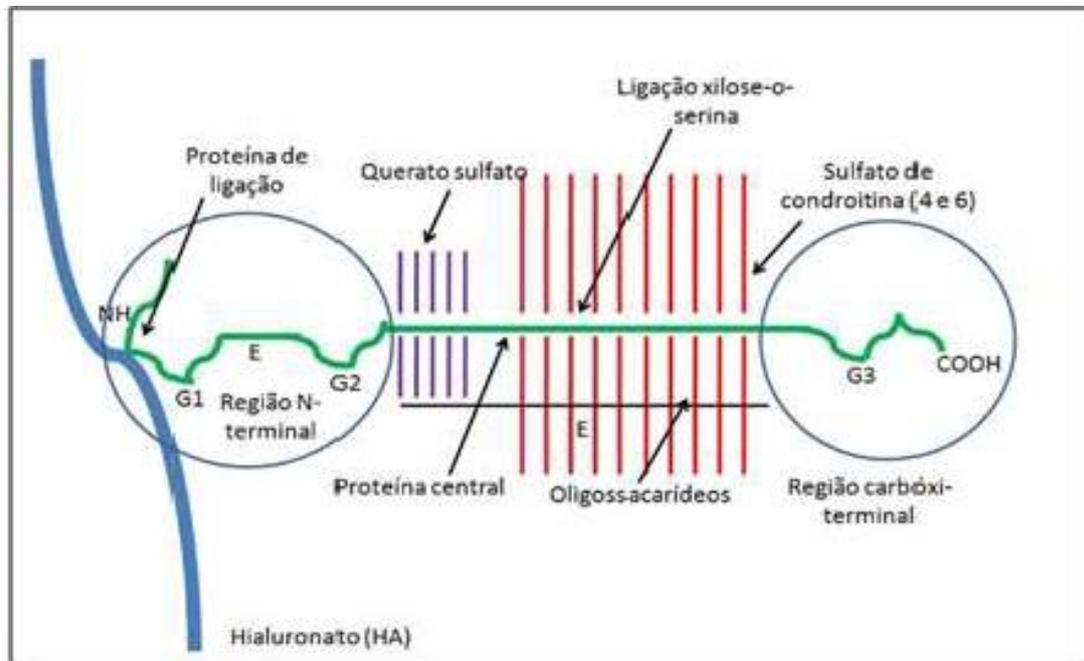
colágenas, e grau de hidratação médio de 70% (PALUKURU et al., 2014). É uma estrutura avascular e, por não possuir irrigação sanguínea, sua nutrição e regeneração é mais difícil e lenta, ocorrendo por difusão. Além disso, não possui inervação, fato que não permite que a dor pelo desgaste da cartilagem apareça precocemente, mas quando já foi profundamente danificada e atingiu a parte óssea subcondral (ARMIENTO et al., 2018). Histologicamente, a cartilagem exibe quatro regiões distinguíveis: superficial ou tangencial (superfície articular), média ou de transição (fibrilas colágenas), profunda ou radial (fibrilas colágenas, proteoglicanos e água), e cartilagem calcificada (espaço entre a cartilagem e o osso subcondral) (ESPANHA et al., 2010). Além de desempenhar um papel estrutural, a matriz extracelular, possui função de regulação, constituindo um meio importante de interação dos seus constituintes com os condrócitos (WANG et al., 2001).

As fibras colágenas contribuem com cerca de 50 a 60% do peso seco da cartilagem e tem importância nas propriedades biomecânicas da cartilagem. Tornam o tecido mais resistente através da propriedade de estabelecimento de ligações cruzadas, que restringe o movimento molecular e o número de sítios disponíveis para hidratação, tornando o tecido mais resistente. Neste cenário, o colágeno do tipo II é predominante, formando a estrutura das fibrilas, entretanto, o do tipo XI também apresenta papel fundamental na gênese das fibrilas e o do tipo IX, localizado na superfície, participa das interações com os proteoglicanos e demais elementos da matriz extracelular, sendo importante na sua organização e estabilização (LUO et al., 2017). Com relação à organização das fibras colágenas, na zona superficial estas se dispõem paralelamente à superfície, junto aos condrócitos. Nas camadas seguintes, mais profundas, orientam-se aleatoriamente e conferem sustentação aos condrócitos, que se organizam em colunas. Nas camadas basais, estas fibras se organizam de forma vertical, onde se inserem na superfície do osso subcondral (SILVER; BRADICA; TRIA, 2001).

Os proteoglicanos participam com 30 a 35% da cartilagem e tem importância fundamental nas propriedades físico-químicas da matriz extracelular, conferindo alta resistência à cartilagem durante o movimento. Apresentam alta afinidade pela água, possibilitando um meio viscoso no qual os metabólitos e nutrientes difundem-se para interagir com células do tecido. O agrecano é o principal proteoglicano e sua estrutura consiste de uma macromolécula complexa formada por esqueleto protéico (*core protein*), onde se inserem vários glicosaminoglicanos como o queratan, o condroitim-sulfato e o ácido hialurônico. O núcleo proteico consiste de três domínios globulares (G1, G2 e G3) e três inter-globulares, sendo o domínio G1, o local de união entre o agrecano e os glicosaminoglicanos, através da proteína de ligação (*link protein*) (IOZZO; SCHAEFER, 2015) (Figura 1). Várias moléculas

de agregcano podem ligar-se lateralmente a uma longa cadeia de ácido hialurônico, montando um agregado de alto peso molecular.

Figura 7. Estrutura do proteoglicano



Fonte: Nunes (2018)

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são mucopolissacarídeos que compõem todas as membranas celulares e a matriz extracelular, com importante função de manutenção da integridade celular e equilíbrio eletrolítico, dentre outras (OBRIND et al., 1975; KANWAR et al., 1980). São formados por dissacarídeos de alto peso molecular, tendo como unidades monossacarídicas N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina, ácido urônico ou galactose. Os condroitins sulfatados são os glicosaminoglicanos predominantes na cartilagem humana e possibilitam diversas interações biológicas devido às suas sulfatações nas posições 4 e 6. Os sulfatos associados às carboxilas dos ácidos glicurônico e idurônico conferem às cadeias polissacarídicas forte carga negativa global, podendo reter grande quantidade de água (KOWITSCH et al., 2017). O ácido hialurônico, além de constituir os agregados da matriz orgânica da cartilagem, é encontrado livre no líquido sinovial, contribuindo para sua viscoelasticidade característica (lubrificante em movimentos lentos e absorvedor de impactos em movimentos rápidos) (SCOTT et al., 2000).

O padrão de sulfatação dos dissacarídeos dos condroitins, bem como a síntese dos GAGs, sofrem influência da idade, da topografia da superfície articular e a zona da

cartilagem examinada. Camadas profundas da cartilagem imatura possuem cerca de quatro vezes mais resíduos sulfatados que regiões mais superficiais do tecido. Por estas razões, ocorrem alterações na estrutura do agregano e dos agregados formados com o ácido hialurônico, como a redução do tamanho da cadeia da proteína central, culminando no desgaste da articulação (ROUGHLEY et al., 2014).

3.1.3 Manutenção da cartilagem

As propriedades biomecânicas da cartilagem dependem principalmente da integridade da rede colágena e dos agreganos. O excesso de cargas negativas no agregano atrai íons sódio, mantendo a neutralidade elétrica e uma pressão osmótica de hidratação, contrabalançada pela tensão na rede colágeno-proteoglicana e pela sobrecarga da articulação (SETTON et al., 1999). A homeostase da cartilagem é mantida por células como os condrócitos, capazes de secretar enzimas líticas, tais como metaloproteases de matriz (MMP), adamolisinas (ADAM) (AKKIRAJU; NOHE, 2015).

As MMP são produzidas como pró-enzimas, tornando-se ativas mediante clivagem enzimática por proteases dependentes de serina ou cisteína (NAGASE, 1997), podendo, assim, degradar uma variedade de componentes protéicos da matriz (WOESSNER, 1991). Como exemplo, pode-se citar as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e as estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), enzimas essenciais na degradação da matriz extracelular, clivando respectivamente colágeno e proteoglicanos (TROEBERG; NAGASE, 2012).

Os condrócitos também produzem os inibidores tissulares de metaloproteases (TIMP), proteínas estáveis que interagem com as MMP, mantendo uma relação estequiométrica de um para um. Alguns tipos estão presentes na cartilagem articular (TIMP-1 e TIMP-2); a TIMP-3 encontra-se associada à matriz extracelular e um outro subtipo, a TIMP-4, foi encontrada apenas em células cancerosas (LECO et al., 1994; BREW et al., 2000).

As adamolisinas são enzimas típicas de membrana, constituídas por um domínio para desintegrina e outro para metaloproteases, fato que lhes conferem essa denominação (A Desintegrin And Metalloproteinases). Dentro desta família, a ADAM-17 ou TACE (Tumour-necrosis Factor-alpha Converting Enzyme) destaca-se em processos de artropatias devido à sua atuação no processo de clivagem e ativação do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) à sua forma ativa (MOSS et al., 1997).

3.2 Artrite reumatóide

3.2.1 Epidemiologia

Estima-se que de 0,5 a 1% da população mundial adulta tenha sido diagnosticada portadora de artrite reumatóide (AR). No Brasil, dados da Sociedade Brasileira de Reumatologia (2013) relatam que cerca de 1,8 milhões de pessoas são acometidas de AR, sendo mais incidente em mulheres na faixa etária de 30 a 50 anos (CROWSON et al., 2011). A prevalência mais comum em mulheres sugere que o desenvolvimento da doença esteja relacionado com os hormônios femininos, uma vez que pacientes que fazem uso de contraceptivos orais ou em situação de gravidez apresenta importante remissão dos sintomas (JAMES, 1993; OLIVER; SILMAN, 2009; TEMPRANO; SCARBROUGH; FLOREA, 2011).

Estudos relatam que paciente portadores de AR apresentam taxas aumentadas de mortalidade, com a sobrevida diminuída de 3 a 10 anos, a depender da gravidade. As causas mais frequentes de morte são atribuídas a doenças cardiovasculares, linfoproliferativas, infecções e complicações gastrointestinais (CHEHATA et al., 2001; NAVARRO-CANO et al., 2003; SOLOMON et al., 2006). Dentre estes fatores, é importante destacar a relação da AR com sintomas depressivos (MARGARETTEN et al., 2011). É uma doença de difícil prognóstico pois, além dos fatores já mencionados, o tratamento da AR envolve custos elevados, tanto no que diz respeito a fatores diretos (tratamentos com medicamentos, despesas médicas e hospitalares a longo prazo), quanto a fatores indiretos (perda de produtividade pessoal e laboral, absenteísmo e aposentadoria por invalidez) (PINHEIRO et al., 2013).

3.2.2 O processo inflamatório na fisiopatologia da AR

A AR se caracteriza como doença inflamatória crônica autoimune e sistêmica, que culmina na destruição progressiva e irreversível das articulações periféricas, tendo como maiores observações clínicas a dor persistente e, em alguns casos, a perda de função. O processo inflamatório também afeta o osso subjacente, a cartilagem e causa fibrose da cápsula articular (ANIC; MAYER, 2014). À medida que a deformidade progride, a articulação perde toda a estabilidade. Dependendo da gravidade, pode causar sintomas secundários, produzindo alterações em outros órgãos como os pulmões, a membrana que envolve o coração e os olhos.

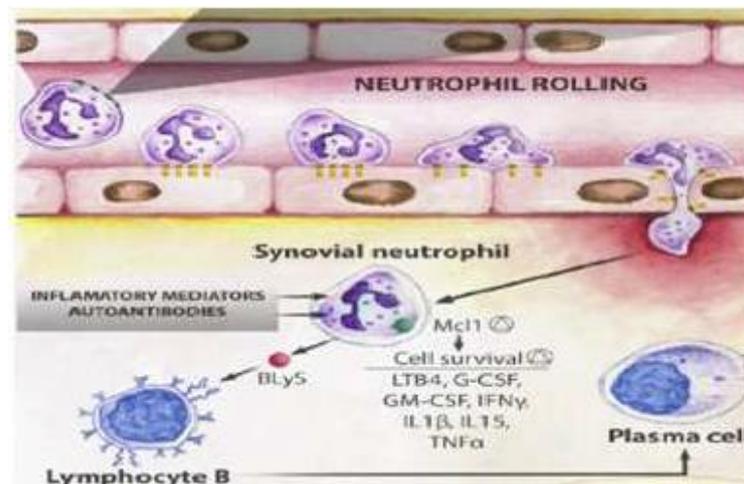
O efeito sistêmico sobre o sangue é um acontecimento comuns, manifestando-se como anemia, que pode aumentar a gravidade da AR (SMYRNOVA, 2014).

O sistema imunológico relaciona-se diretamente com o início, a progressão e a manutenção da AR. Por se tratar de um distúrbio multifatorial, a AR altera o funcionamento tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo. Alterações inflamatórias iniciais, estimuladas pelos neutrófilos, culminam em sinais clínicos peculiares como a sinovite hiperplásica disseminada, infiltrado celular (*pannus* reumatóide) e dor articular (FIRESTEIN; McINNES, 2017).

As células da defesa inata dominam o cenário neste momento, sendo recrutados para a membrana sinovial por diversas quimiocinas (CXC, CXCL5, IL-6) e fragmentos do sistema do complemento (C5a), liberados por células residentes. Também induzem seu próprio recrutamento, retroalimentando a síntese de substâncias quimiotáticas como leucotrieno B4 (LTB4) e IL-1 β (SADIK et al., 2012). Promovem dano articular através da síntese de mediadores como a prostaglandina, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF), o interferon- γ (IFN- γ), interleucinas (IL-1 β , IL-15, TNF- α), espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases. Além da atuação aguda, estudos mostram a importância dos neutrófilos na manutenção do estado inflamatório da AR, já que estes mediadores estimulam a síntese e liberação de autoanticorpos, várias outras citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e também estimulam sinoviócitos à interação com tipos celulares relacionados à imunidade adaptativa (STAMP et al., 2012; CECCHI et al., 2018; PICERNO et al., 2015).

Desta forma, os eventos imunopatológicos que ocorrem na cavidade articular, uma vez repleta de neutrófilos, também sofre ação de células mononucleares, que também atuam de forma importante na progressão da doença. Os neutrófilos, tanto os periféricos como os que estão na sinóvia, produzem a proteína B_{Ly}S, que regula a atividade de células como os linfócitos B, ativando uma resposta imune. Estas células desempenham um papel chave na apresentação de antígenos, produção de auto-anticorpos e síntese de mediadores inflamatórios. Uma vez ativadas, aumentam o dano e o influxo sanguíneo na articulação (Figura 8) (CHOY, 2012; CECCHI et al., 2018).

Figura 8. O papel dos neutrófilos na AR.



Fonte: Adaptado de Cecchi (2018)

Os auto-anticorpos produzidos pelos linfócitos T apresentam papel fundamental no início da doença e constituem-se como marcadores de diagnóstico clínico. Reagem com outros anticorpos presentes na sinóvia e produzem complexos imunes, ativação do sistema do complemento e grave destruição tecidual. Estão relacionados às piores manifestações da AR, incluindo as extra-articulares. Entre eles estão envolvidos os anti-CCP (contra peptídeos citrulinados cíclicos) e o fator reumatóide (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROT; 2013).

O processo inflamatório da AR também ativa os linfócitos do tipo T, sobressaindo-se os tipos efetores nas articulações. Estes atuam na produção inicial de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α , citocina alvo de muitas terapias biológicas envolvendo inflamação articular. As células T reguladoras, também presentes na periferia da sinóvia, parecem ineficazes frente às células inflamatórias e os mediadores liberados a partir da ativação delas, o que faz com que a doença progrida. Além disso, a autorreatividade destas células, assim como as do tipo B também, possibilita a síntese de muitas substâncias inflamatórias, o que contribui ainda mais para a amplificação da inflamação sinovial (MORADI et al., 2014; VEALLE; ORR; FEARON, 2017).

Além destas, outros tipos celulares efetores podem ser encontrados na sinóvia durante a progressão da doença, tais como macrófagos, mastócitos, células NK. Os macrófagos são células fundamentais na sinovite, pois são considerados uma das principais fontes de mediadores pró-inflamatórios e quimiocinas, como o TNF- α , IL-1 β , CXCL8, que participam da modulação de todo o processo fisiopatológico da AR, ativando

diversos tipos celulares. Adicionalmente, secretam enzimas que degradam o tecido articular (proteases), amplificado a cronificando a resposta inflamatória, inclusive modulando a dor, sinal peculiar da AR. Em contrapartida, podem produzir citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10, que atuam na secreção de inibidores de proteases, promovendo respostas de proteção contra a inflamação e a sensibilidade neuronal (VEALLE; ORR; FEARON, 2017; WRIGHT et al., 2012; KATSIKIS et al., 1994).

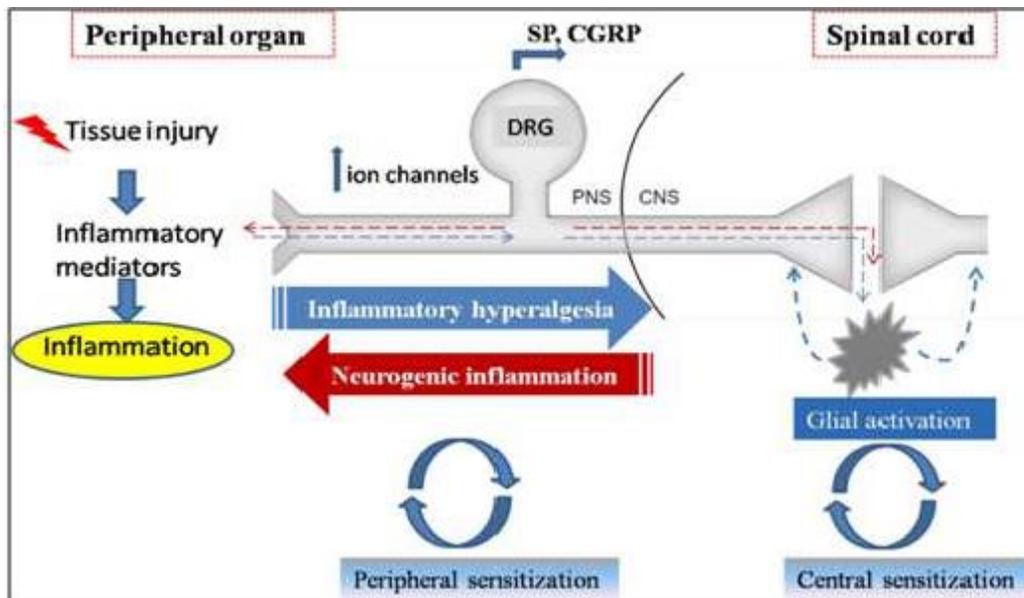
3.2.3 Dor inflamatória na AR

Um dos sintomas identificados como mais importantes e persistentes na AR é a dor, portanto, contribui de maneira definitiva para a avaliação clínica e condutas terapêuticas. Na AR, a dor resulta da interação entre o estado inflamatório das articulações e o processamento dos sinais de dor pelas vias periféricas, espinhais e supraespinhais do sistema nervoso (ZHANG; LEE, 2018; WALSH; McWILLIAMS, 2014).

Os mecanismos periféricos da dor incluem a ativação direta de nociceptores, que expressam um ou mais receptores de superfície celular para o reconhecimento e interação dos mediadores com a célula. A partir desta interação, as células imunes residentes secretam citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α), quimiocinas (MCP-1), prostanóides (PGE₂ e PGI₂), bradicinina, fatores de crescimento neurais (VEGF), endotelina e aminas simpáticas. Em resposta aos mediadores inflamatórios, as vias de sinalização levam a geração de potenciais de ação, culminando com a redução do limiar dos nociceptores e com o aumento da sensibilidade à dor (SCHAIBLE, 2014; PINHO- RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). Quando a sensibilização dos nociceptores ocorre desta forma, a dor gerada é de origem inflamatória, ativada por via não-neuronal, apresentando alta dependência de mediadores químicos para que a propagação do estímulo doloroso aconteça. Estas substâncias também atuam em células não neuronais e estimulam a produção de mais mediadores inflamatórios, mais uma fator que aumenta a dor local (WALSH; McWILLIAMS, 2014).

Além destes mecanismos, a sensibilização de nociceptores também pode ocorrer por uma via neuronal, em que os mediadores atuantes são neuropeptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGPR), sendo liberados do corpo celular para a periferia (Figura 9). Dependendo da natureza e concentração do mediador, ele pode ativar diretamente o nociceptor e/ou reduzir seu limiar de ativação (VARDEH, NARANJO, 2017).

Figura 9. Vias de ativação de nociceptores na dor da AR



Fonte: Singh (2018)

3.2.4 Principais mediadores inflamatórios na AR

Os mediadores inflamatórios desempenham papel crítico tanto nas respostas inflamatórias como na geração dos sinais nociceptivos processados em dor. Os danos teciduais que originam as respostas de inflamação e dor são acompanhados pela liberação de mediadores inflamatórios, que estimulam a migração celular e a ativação de nociceptores, sinais clínicos prevalentes da AR (FIRESTEIN; McINNES, 2017).

- Citocinas:

O TNF- α é uma potente citocina que atua no início da injúria tecidual, e no desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias crônicas. Produzido majoritariamente por monócitos e macrófagos residentes, têm papel central na ativação de outras citocinas pró-inflamatórias, desempenhando atividades quimiotática e vascular (aumento de permeabilidade e angiogênese). Também estimula o aumento de mediadores lipídicos, tais como prostaglandinas, desempenhando um papel importante na modulação da hiperalgesia inflamatória e neuropática. Atua na ativação de outras células inflamatórias como os neutrófilos, os sinoviócitos e os linfócitos T, mediando a relação entre a imunidade inata e adaptativa na AR (SCHAIBLE, 2014; RIDGLEY; ANDERSON; PRATT, 2018). Estudos recentes demonstraram a relação do TNF- α com os níveis de serotonina e o desenvolvimento

de depressão em paciente com AR (KRISHNADAS et al., 2016).

A IL-1 β é uma citocina inflamatória primária, liberada durante a lesão celular por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Atua na vasodilatação, aumento de permeabilidade e no aumento da expressão de moléculas de adesão, estimulando o processo de migração celular. Ativa células T para a diferenciação do eixo TH17, importante na produção de IL-17. Também tem participação na ativação de osteoclastos, modulando o processo de erosão óssea. Em altas concentrações, entra na circulação e passa a exercer efeitos endócrinos induzindo a febre e a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (RIDGLEY; ANDERSON; PRATT, 2018). Também é expressa em neurônios e no gânglio da raiz dorsal, no sistema nervoso, desempenhando papel fundamental em vários modelos de dor, juntamente com o TNF- α , inclusive na artrite reumatóide. Cascatas de sinalizações estimuladas por IL-1 β levam à liberação de moléculas como a prostaglandina E2, substância P, IL-6 e metaloproteinases pelos neurônios e células da glia (NIETO et al., 2016).

A IL-6 é uma citocina proveniente de linfócitos (B e T), macrófagos e sinoviócitos. Tem ação pleiotrópica, influenciando as respostas antígeno-específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores de fase aguda. Contribui para o desenvolvimento da AR estimulando sinoviócitos na produção de fatores de crescimento (VEGF), MMPs e IFN γ ; e também na estimulação de células T à produção de IL-17 (SCHINNERLING et al., 2017; RIDGLEY; ANDERSON; PRATT, 2018). Participa de processos dolorosos através de sua produção por neurônios após contato com agente lesivo, sendo regulada positivamente por eicosanóides, como a PGE₂ (ST-JACQUES; MA, 2011).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzidas por células T helper 17 (Th17). São uma linhagem de células T CD4+ indutoras da inflamação tecidual, identificadas com um papel majoritário no desenvolvimento de doenças autoimunes (LUBBERTS, 2015). Na AR, tem função de promover a ativação, maturação e sobrevivência dos neutrófilos. Além da ativação de outros tipos celulares como os sinoviócitos, induzindo a produção de outras citocinas (TNF- α e IL-6), estão também envolvidas na ativação de condrócitos e produção de metaloproteinases, contribuindo para o processo de degradação da matriz extracelular. Seus efeitos inflamatórios também culminam na osteoclastogênese e na reabsorção óssea (RIDGLEY; ANDERSON; PRATT, 2018). Vale destacar a importante relação entre a IL-17 e a L-23, uma vez que esta citocina promove a polarização de linfócitos T não ativados para a formação do eixo Th17, ao mesmo tempo que inibe a diferenciação de células T reguladoras, contribuindo para progressão e exacerbação da doença (LUBBERTS, 2015).

O IFN- γ é produzido principalmente pelos linfócitos Th1 ativados, durante a fase

efetora da resposta imune adquirida. Apresenta uma ação importante sobre macrófagos e células dendríticas, além de outras células, que consiste na potencialização da ação microbicida pelo aumento da atividade fagocítica e maior produção de IL-12, TNF- α entre outros mediadores inflamatórios. Estudos mostram seu envolvimento na destruição cartilagem articular e na reabsorção óssea, o que aumenta a severidade da doença (ALVES et al., 2016).

- Mediadores lipídicos:

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos, liberadas na fase inicial da AR. São oriundas do metabolismo do ácido araquidônico e têm sua síntese desencadeada pela ação da enzima fosfolipase A₂, através da liberação dos fosfolipídeos da membrana celular. A prostaglandina E₂ (PGE₂) aumenta a permeabilidade vascular e induz vasodilatação, angiogênese, infiltração de leucócitos e hiperplasia sinovial, atuando de forma crítica no processo de inflamação sinovial e edema articular. Também atua na manutenção da resposta imune, modulando a produção de citocinas pelas outras células inflamatórias. São importantes sensibilizadores de nociceptores periféricos, ação que pode ser potencializada por ROS, como o óxido nítrico (CHENG; WU; DU, 2020). Também estão envolvidas na produção de enzimas que degradam a cartilagem e atuam na reabsorção óssea (BROUWERS et al., 2015).

- Espécies Reativas de Oxigênio (ROS):

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel produzido por vários tipos celulares e está envolvido na patogênese de muitas doenças. Ele é originado a partir da oxi-redução da L-arginina pela NO sintase (NOS), enzima de conversão que pode ser agrupada em três tipos de isoformas de NOS: a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), formas constitutivas e com atividade dependentes de Ca⁺⁺; e a iNOS, forma induzida e que não depende de Ca⁺⁺. O NO produzido pela iNOS está intimamente envolvido na manutenção da resposta inflamatória (SALVEMINI et al., 1996).

Um aspecto marcante desta molécula é a sua ambiguidade nos organismos, demonstrando capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual. Além de atuar como potente vasodilatador, ativa células residentes como os linfócitos T e B e neutrófilos. Estudos demonstraram o aumento dos níveis da enzima iNOS na sinóvia e na cartilagem de pacientes portadores de artrite, sendo esta produção do NO controlada por citocinas como TNF- α , IL-1 e IFN- γ , causando inflamação crônica. Além disso, são importantes na manutenção da dor inflamatória da AR, sensibilizando nociceptores periféricos (SPILLER et al., 2019).

3.2.5 Terapêutica atual versus compostos naturais vegetais

A terapêutica medicamentosa aplicada para controle e alívio dos sintomas da AR envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais/analgésicos, corticóides e terapias imunossupressoras como as drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença (DMARDs). Este grupo abrange as drogas sintéticas, que são as utilizadas como primeira linha, isoladas ou associadas à outras drogas. Elas incluem o metotrexato (MTX), a hidroxicloriquina e a sulfasalazina. Também fazem parte deste grupo as drogas biológicas, incluindo os bloqueadores de TNF- α (infiximab) e IL-6 (tocilizumab) (CRONSTEIN; AUNE, 2020; SMOLEN et al., 2016, 2017; TANAKA, 2013). Apesar dos benefícios destes medicamentos, que incluem a remissão das lesões articulares e das dores, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes, são relatados efeitos colaterais graves que podem restringir o seu uso à longo prazo, tais como hipertensão, hiperglicemia, imunossupressão, transtornos cardiovasculares, renais e gastrointestinais, dentre outros (GOUT; ÖSTÖR; NISAR, 2011; MÖLLER et al., 2015). Estes fatores têm estimulado as pesquisas de novos produtos que possam ter eficácia adequada e menos efeitos indesejados, como os constituintes natural de plantas.

Princípios ativos isolados de plantas medicinais com propriedades anti-inflamatória e analgésica vêm sendo amplamente estudados pelo seu potencial no tratamento de doenças, como a artrite e osteoartrite. Vários estudos focados no processo inflamatório articular relatam os efeitos promissores de substâncias purificadas ou extratos de origem vegetal (DRAGOS et al., 2017). A curcumina, administrada oralmente, e a quercetina, administrada por via subcutânea, diminuíram o infiltrado leucocitário e a produção de mediadores inflamatórios nas membranas sinoviais de ratos (NONOSE et al., 2014; GUAZELLI et al., 2018). Os extratos hidroetanólico e etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-vermelha) e *Eryobotrica japonica*, respectivamente também inibiram a migração celular na articulação e, esta última, a dor inflamatória induzida por zimosan (ROSAS et al., 2015; KURAOKA-OLIVEIRA et al., 2019). Um polifenol extraído do chá verde teve ação reconstrutora da cartilagem e foi capaz de reestabelecer a atividade locomotora de camundongos em modelo de osteoartrite induzida por desestabilização cirúrgica de menisco (LEONG et al., 2014). Com relação aos extratos brutos de plantas, o tratamento oral de ratos com o chá das folhas de *Camellia sinensis* (chá preto indiano) reduziu a peroxidação lipídica no tecido articular, em modelo de poliartrite induzida por adjuvante de Freund (ROY et al., 2008); assim como o extrato aquoso das folhas de *Libidibia ferrea*, rico

em polifenóis, apresentou atividade anti-oxidante e anti- inflamatória na inflamação articular em joelho de ratos, induzida por zimosan em ratos (FALCÃO et al., 2019).

Entretanto, apesar da relevância dos estudos envolvendo vários alvos moleculares, pouco se têm explorado sobre possíveis sinais de toxicidade decorrente do tratamento com estes compostos.

3.2.6 Atividades de polissacarídeos de plantas na inflamação articular

Dentre os constituintes de plantas os polissacarídeos apresentam potencial aplicação terapêutica devido a sua ampla biodisponibilidade, fácil obtenção e baixa ou nenhuma toxicidade (OVODOV, 1998; DIALLO et al., 2001; KWEON; SONG; PARK, 2003).

Nos processos inflamatórios articulares, um polissacarídeo isolado de *Ephedra sinica* inibiu parâmetros inflamatórios *in vivo*, como infiltrado celular e edema articular, diminuindo também as concentrações séricas de TNF- α , IL-1 β , PGEs, IL-6 em animais com artrite induzida por adjuvante em ratos; além de diminuir os níveis de NO e PGEs em cultura de células monocíticas (WANG et. al, 2016). *In vitro*, polissacarídeos isolados da planta *Astragalus membranaceus* atenuam a produção de citocinas inflamatórias em cultura de sinoviócitos estimuladas com IL-1 β (MENG et al., 2017). Adicionalmente, polissacarídeos oriundos da planta *Angelica sinensis* inibiram parâmetros de estresse oxidativo da osteoartrite, tais como MDA, peróxido de hidrogênio e NO em condrócitos humanos (ZHUANG et al., 2018).

Nas processos envolvendo dor inflamatória, a galactomanana extraída de *Cyamopsis tetragonolobus* inibe a dor da osteoartrite experimental (CASTRO et al., 2007); e a glucoronoxilomanana isolada da levedura *Cryptococcus neoformans* reduz a severidade da artrite reumatóide em roedores (MONARI et al., 2009).

3.2.7 Polissacarídeos de Ximenia americana

Um estudo anterior do nosso grupo (descrito no capítulo I deste trabalho) demonstrou a ação anti-inflamatória da decocção (chá) e das frações polissacarídicas obtidas das cascas de *X. americana* em modelos de inflamação aguda induzida por zimosan em camundongos (MARQUES et al., 2020). Também já foi demonstrado anteriormente o efeito das frações polissacarídicas de *X. americana* em modelos animais que mimetizam

características clínicas da pancreatite (SILVA-LEITE et al., 2018). Um estudo recente relatou o efeito inibitório do chá das cascas de *X. americana* sobre a migração de neutrófilos em modelo de gastrite experimental induzida por indometacina em camundongos (SILVA-PANTOJA et al., 2018). Apesar dos efeitos relatados na literatura, ainda são escassos estudos envolvendo efeito e mecanismos de polissacarídeos isolados de plantas em modelo de artrite e, para a planta de *X. americana*, os dados são inexistentes.

3.2.8 Modelo experimental de artrite induzida por zimosan

Vários modelos animais têm sido empregados no intuito de se reproduzir clinicamente os sintomas da AR, visando uma melhor compreensão da sua fisiopatologia e fundamentações científicas para a implementação de novas terapêuticas alternativas às existentes. Os modelos de artrite até então empregados são induzidos por diferentes estímulos, a depender do foco da investigação, onde podem ser utilizados como agentes flogísticos zimosan, ovalbumina, colágeno, antígenos, etc (ASQUITH et al., 2009).

O zimosan é uma substância originada a partir da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevesiae*. Quando administrado em tecidos, tem capacidade de induzir inflamação na pata, na cavidade peritoneal e na cavidade articular de ratos (DOHERTY et al., 1985; GADÓ e GIGLER, 1991). Especificamente na articulação de roedores provoca edema, redução de proteoglicanos na cartilagem, diminuição da atividade locomotora (GEGOUT et al., 1994), influxo de células e liberação de mediadores inflamatórios como os eicosanóides e aumento da permeabilidade vascular (GRIFFITHS et al., 1991). Sabe-se que há a importante participação de TNF- α e IL-1 β , que podem ser modulados por citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 (VALE et al., 2004; VALE et al., 2003). É notável a importância e o papel dual do NO na artrite induzida por zimosan, uma vez que inibidores da iNOS diminuem a dor apenas em esquema de pré-tratamento (antes do zimosan) e que animais, quando tratados com substâncias doadoras de NO após a indução da artrite, apresentam inibição da dor, independente da formação de edema (ROCHA et al., 2002).

Outro fator clínico bem presente em pacientes humanos portadores de AR é a limitação de movimentos ou até mesmo a perda de função, em casos mais graves. Na artrite experimental induzida por zimosan foi demonstrada a incapacitação articular em joelhos de ratos (ROCHA et al., 1999), através de uma adaptação à avaliação na deambulação destes animais (TONUSSI e FERREIRA, 1992), refletindo o processo de hipernocicepção articular,

que ocorre entre 3 e 4 horas após a indução da artrite. A sensibilização dos receptores de dor específicos no tecido periarticular, em vez de tecido sinovial, é responsável por distúrbios da marcha na artrite induzida por zimosan (ROCHA et al.,1999).

Guerrero e colaboradores (2006) adaptaram a artrite induzida por zimosan para a articulação tíbio-tarsal de camundongos. Neste contexto, a hipernocicepção, avaliada em analgesímetro digital, se mostrou máxima na 7^a hora após a indução e permaneceu elevada por até quatro dias. Além disso, foi observada uma intensa migração de neutrófilos, pela mensuração da atividade da mieloperoxidase e análise histopatológica das articulações dos animais. Apesar de permitir avaliações conclusivas de alguns parâmetros marcantes da patologia, o modelo apresenta desvantagens no que se diz respeito ao fornecimento reduzido do fluido articular e da cartilagem, fontes de mediadores inflamatórios, citocinas, glicosaminoglicanos e outros componentes da matriz, que apresentam alterações e podem fornecer informações importantes durante o processo inflamatório da artrite experimental.

No intuito de minimizar essas desvantagens, Bringel e colaboradores (2020) desenvolveu o modelo de artrite induzida por zimosan em articulações tíbio-tarsal de ratos, uma espécie de maior porte. Os resultados deste estudo seguiram o padrão do que já se vinha sendo estabelecido para o modelo de artrite em roedores: zimosan estimulou influxo de leucócitos tanto na 6^a h quanto no 14^o após a indução, e induziu hipernocicepção de maneira significativa da 2^a hora até o 14^o dia de avaliação. No fluido sinovial foram encontradas citocinas em concentrações elevadas, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-13; fatores de crescimento como VEGF, GM-CSF, entre outros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

A avaliação das atividades anti-inflamatória e anti-hipernociceptiva do chá e dos polissacarídeos obtidos a partir das cascas do caule da planta *Ximenia americana* foi realizada antes e depois da indução da artrite com zimosan na articulação tíbio-tarsal de ratos, por meio da mensuração dos seguintes parâmetros: infiltrado leucocitário, edema articular e hiperalgesia. O fluido sinovial e as articulações foram coletados e estocados para dosagens, análises histopatológicas.

4.2 Material

4.2.1 Planta

A espécie utilizada no estudo foi a *Ximenia americana* (Olacaceae). A planta foi coletada no município de Custódio (Quixadá-CE) e a sua exsicata está depositada na FECLESC/Quixadá e no Herbário Prisco Bezerra da UFC (nº 46794).

4.2.2 Obtenção do chá de *Ximenia americana*

O chá das cascas do caule de *X. americana* foi obtido por decocção em água destilada (100°C/5 min). Em seguida foi liofilizado para a utilização nos testes animais.

4.3 Protocolos experimentais

4.3.1 Animais

Foram utilizados Ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*), pesando entre 200 e 220 g (60 dias), oriundos do Biotério Central da UFC e da UNICHRISTUS. Os animais foram mantidos em temperatura e luminosidade controladas, recebendo ração e água *ad libitum*. Cada grupo experimental foi formado por 8 animais (n=8). Todos os protocolos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (CEUA/UECE Nº 4153018/2018).

4.3.2 Modelo de artrite induzida por Zimosan

Os animais foram anestesiados (cetamina 50 mg/kg + xilazina 5 mg/kg; via intramuscular – i.m.) antes da indução da artrite com zimosan (300 mg/25 ml), na articulação tíbio-tarsal direita de ratos (BRINGEL, 2020). O grupo controle recebeu salina.

4.3.3 Tratamento dos animais

A decocção (chá) das cascas de *X. americana* foi administrada por via oral (100 mg/kg; v.o.) e as frações polissacarídicas desproteïnadas – FI (0.1 M) e FII (0.25 M) foram administrados por via endovenosa (1 mg/kg; e.v.) em esquema de pré-tratamento (1 hora antes) ou pós-tratamento (3 horas após) da indução da artrite.

4.3.4 Avaliação da hipernocicepção

A resposta hipernociceptiva de flexão articular e retirada da pata foi avaliada, imediatamente antes (tempo zero), 1-6 h, 12 h, 24 h da indução da artrite. Para isso, os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico, onde foi aplicada uma pressão no centro da pata com uma sonda de área larga (4,15 mm²), acoplada a um analgesímetro digital, que registrou as pressões em cada animal. O teste foi repetido por até 6 vezes, com exclusão dos valores máximos e mínimos de um mesmo animal (BRINGEL, 2020).

4.3.5 Avaliação da Migração celular

Após a avaliação da resposta hipernociceptiva (6 horas, 14 dias), os animais foram eutanasiados para a coleta do fluido sinovial através da lavagem das articulações com 200 µl de PBS contendo EDTA dissódico 10 mM para: a) avaliação da migração de leucócitos totais em câmara de Neubauer e contagem diferencial em lâminas coradas com H & E (SOUZA; FERREIRA, 1985); b) dosagens de mediadores inflamatórios.

4.3.6 Avaliação histopatológica

A articulação tíbio-tarsal esquerda dos animais foram removidas, fixadas em formaldeído (10%), descalcificada em EDTA dissódico (10%), impregnadas em parafina fundida a 60 °C. Após a formação dos blocos, preparou-se os cortes histológicos (5 µm de espessura) através de micrótomo, seguidos de coloração com H & E. Os parâmetros avaliados na histopatologia foram: arquitetura do tecido, presença de edema, de infiltrado polimorfonuclear, todos observados em microscópio ótico (adaptado de ANDRADE et al., 2011).

4.3.7 Análise estatística

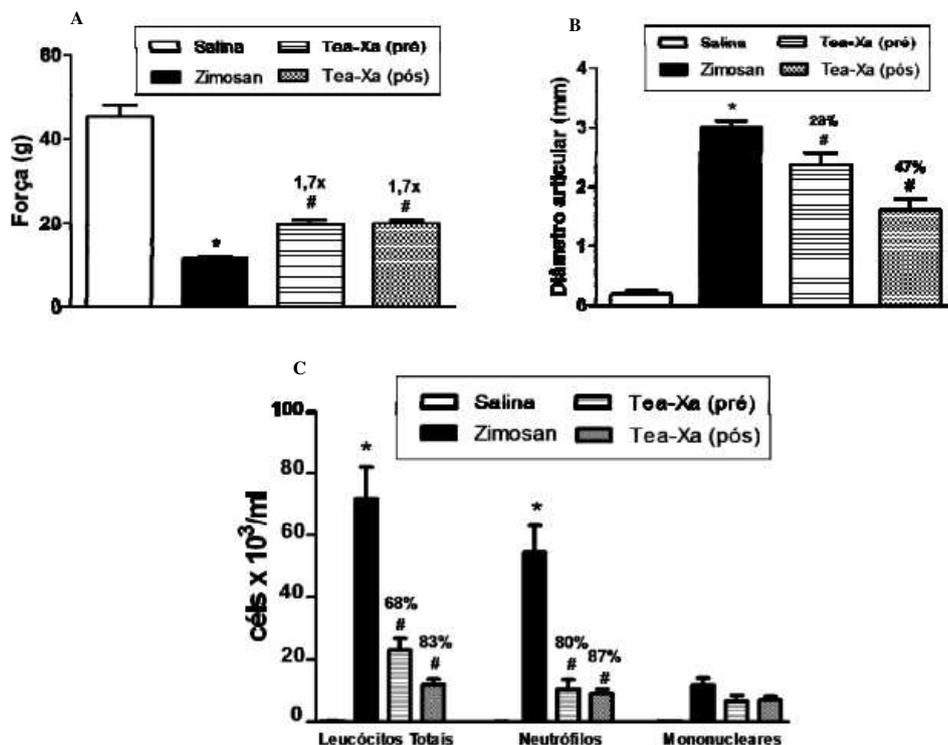
Os resultados foram expressos como \pm E.P.M. (erro padrão da média), submetido à Análise de Variância (ANOVA) ou ao teste t. considerando-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Para comparação múltipla dos resultados histopatológicos os resultados foram expressos como mediana (intervalo interquartil) e utilizado o teste de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 O chá de *X. americana* inibe parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquemas de pré e pós-tratamento

A injeção intra-articular de zimosan (500 μ g) reduziu o limiar nociceptivo em resposta a pressão aplicada na pata dos animais, avaliada 6 h após estimulação (zimosan: 11,4 \pm 0,5 g vs. salina: 45,2 \pm 2,6 g). O chá de *X. americana* (100 mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo dos animais em 1,7 x, tanto em esquema de pré- (19,52 \pm 1,3 g) quanto de pós-tratamento (20,0 \pm 0,7 g) (Figura 10A). Zimosan também induziu aumento do edema articular, comparado ao controle (3,0 \pm 0,1 mm vs. salina: 0,1 \pm 0,0 mm), parâmetro que também foi reduzido em 23% pelo pré- (2,3 \pm 0,2 mm) e em 47% pelo pós-tratamento com Tea-Xa (1,6 \pm 0,1 mm) (Figura 10B). Nesta mesma hora, zimosan causou influxo leucocitário, majoritariamente marcado por aumento de neutrófilos (54525 \pm 8673 células vs. salina: 74 \pm 30 células), que foi reduzido por Tea-Xa em 80% no pré- (10539 \pm 2886 células) e em 87% no pós-tratamento (9032 \pm 1442 células) (Figura 10C).

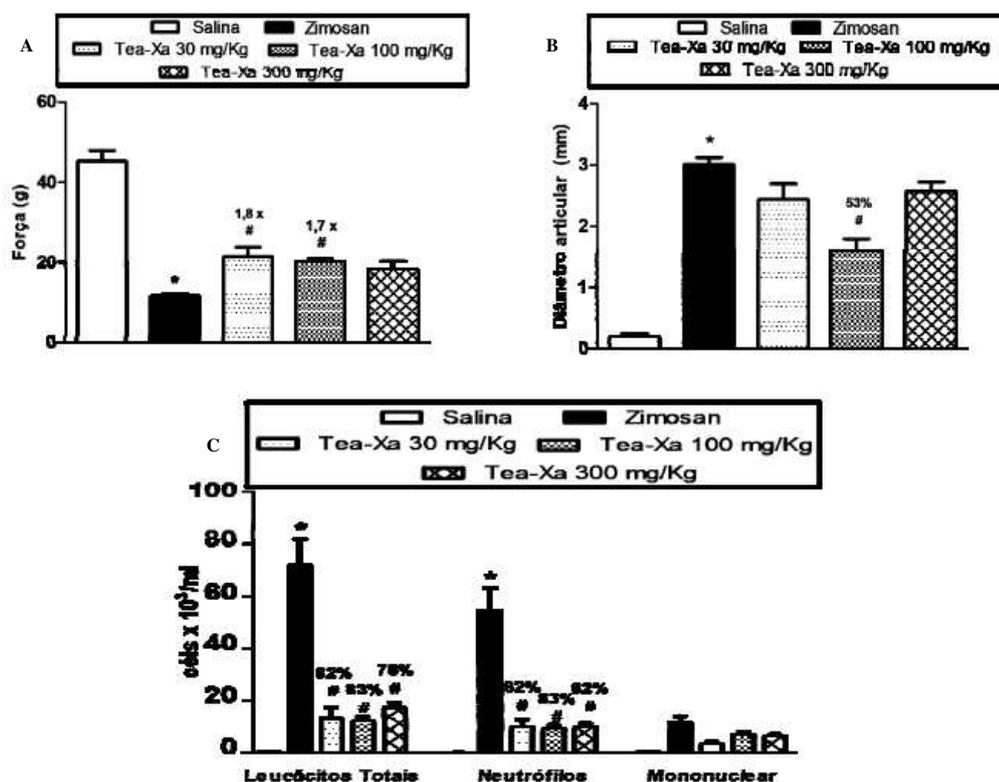
Figura 10. Efeito inibitório do chá de *X. americana* sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquemas de pré e pós-tratamento. Zimosan (500 μ g) foi administrado na articulação tibio-tarsal de ratos 2 h antes do tratamento com Tea-Xa (100 mg/kg; v. o.). O grupo controle recebeu salina estéril. Após 6 h, os animais foram eutanasiados para avaliação. (A) Hiperalgisia; (B) Edema articular; (C) Infiltrado leucocitário. Média \pm EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni *p < 0,05 vs. salina. #p < 0,05 vs. zimosan. Tea-Xa: chá de *X. americana*.



5.2 Curva dose-resposta do efeito inibitório do chá de *X. americana* na artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento

A injeção intra-articular de zimosan (500 μ g) reduziu o limiar nociceptivo em resposta a pressão aplicada na pata dos animais, avaliada 6 h após estimulação (zimosan: 11,4 \pm 0,5 g vs. salina: 45,2 \pm 2,6 g). O chá de *X. americana* aumentou o limiar nociceptivo dos animais nas doses de 30 mg/kg (1,8 x) e 100 mg/kg (1,7 x) (Figura 11A). Zimosan também induziu aumento do edema articular, comparado ao controle (3,0 \pm 0,1 mm vs. salina: 0,1 \pm 0,0 mm), parâmetro também reduzido pelo tratamento com o chá, porém somente na dose de 100 mg/kg (47%) (1,6 \pm 0,1 mm) (Figura 11B). Nesta mesma hora, zimosan causou influxo leucocitário, majoritariamente marcado por aumento de neutrófilos (54525 \pm 8673 células vs. salina: 74 \pm 30 células), que foi reduzido por Tea-Xa em 82% na dose de 30 mg/kg (9691 \pm 3224 células), em 83% na dose de 100 mg/kg (9032 \pm 1442 células) e em 82% na dose de 300 mg/kg (9865 \pm 1333 células) (Figura 11C).

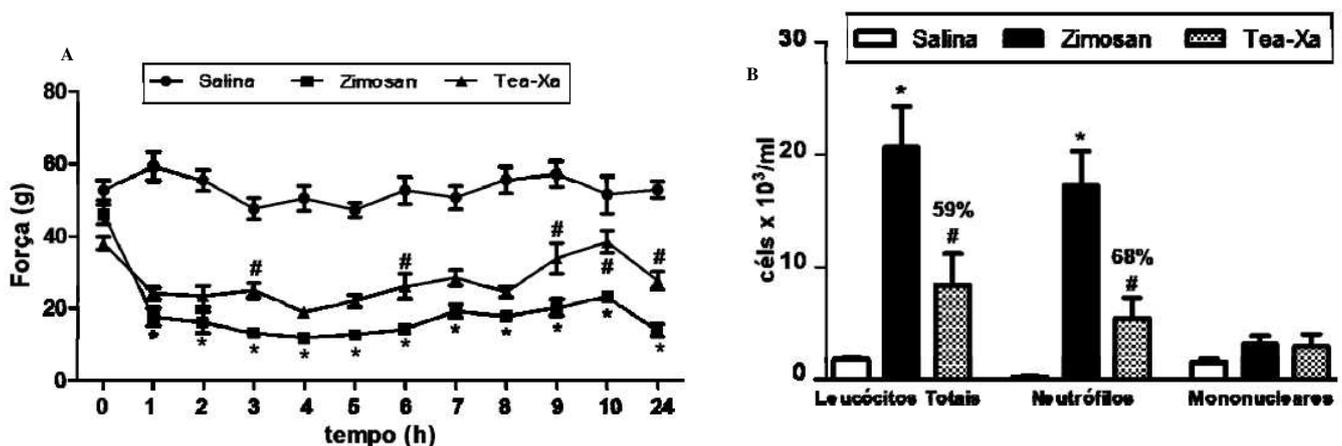
Figura 11. Curva dose-resposta do efeito inibitório do chá de *X. americana* sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan. Zimosan (500 μ g) foi administrado na articulação tibio-tarsal de ratos 2 h antes do tratamento com Tea-Xa (30, 100 e 300 mg/kg; v. o.). O grupo controle recebeu salina estéril. Após 6 h, os animais foram eutanasiados para avaliação. (A) Hiperalgesia; (B) Edema articular; (C) Infiltrado leucocitário. Média \pm EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni *p<0,05 vs. salina. #p<0,05 vs. zimosan. Tea-Xa: chá de *X. americana*.



5.3 Curva de duração do efeito inibitório do chá de *X. americana* na artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento

Zimosan ($500\mu\text{g}$) reduziu o limiar nociceptivo em resposta a pressão aplicada na pata dos animais durante todo o curso temporal da hipernocicepção. O tratamento com o chá de *X. americana* aumentou o limiar nociceptivo dos animais 3 h após tratamento em 2x ($24,9 \pm 2,1$ g vs. zimosan: $13,0 \pm 1,5$ g); 6 h após tratamento em 2x ($26,0 \pm 3,5$ g vs. zimosan: $14,2 \pm 1,0$ g); 9 h após tratamento em 1,7 x ($33,8 \pm 2,9$ g vs. zimosan: $20,1 \pm 2,2$ g); 10 h após tratamento em 1,7 x ($38,3 \pm 2,9$ g vs. zimosan: $23,0 \pm 0,9$ g) e 24 h após tratamento em 2 x ($27,7 \pm 2,5$ g vs. zimosan: $13,8 \pm 1,8$ g) (Figura 12A). Além disso, 26 horas após indução, zimosan provocou influxo leucocitário significativo, majoritariamente polimorfonuclear, em comparação com o controle (1723 ± 305 células vs. salina: 21 ± 3 células), que foi diminuído pelo tratamento com o chá de *X. americana* em 68% (547 ± 178 células) (Figura 12B).

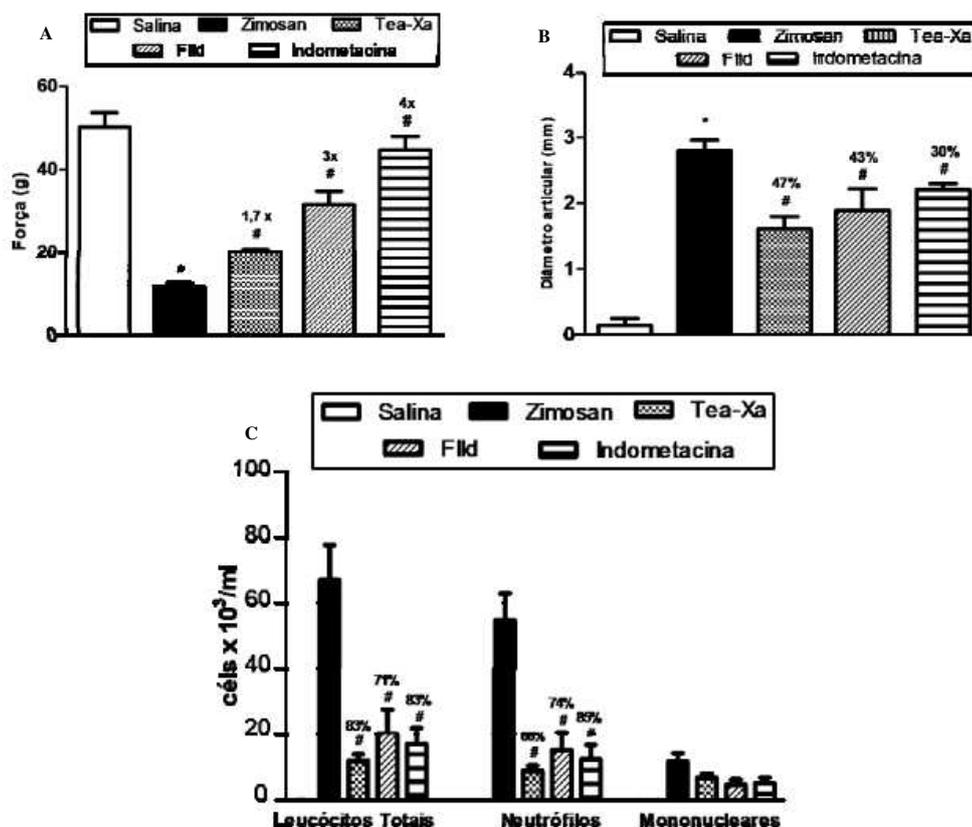
Figura 12. Curva de duração do efeito inibitório do chá de *X. americana* na artrite induzida zimosan. Zimosan($500\mu\text{g}$) foi administrado na articulação túbio-tarsal de ratos 2 h antes do tratamento com o Tea-Xa (100 mg/kg ; v.o.). O grupo controle recebeu salina estéril. Os animais foram avaliados de 1 a 10 h e 24 h após o tratamento.(A)Hiperalgésia; (B) Infiltrado leucocitário (24 h).Média \pm EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni * $p < 0,05$ vs. salina. # $p < 0,05$ vs. zimosan. Tea-Xa: chá de *X. americana*.



5.4 FII desproteínada inibe parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento.

A injeção intra-articular de zimosan (500 μ g) reduziu o limiar nociceptivo em resposta a pressão aplicada na pata dos animais, avaliada 6 h após estimulação (11,6 \pm 0,8 g vs. salina: 50,2 \pm 3,4 g). FII (1 mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo dos animais em 3 x (31,6 \pm 3,1 g). O controle de indometacina aumentou o limiar dos animais em 4 x (44,5 \pm 3,1 g) (Figura 13A). Zimosan também provocou aumento do edema articular, comparado ao controle (2,8 \pm 0,1 mm vs. salina: 0,1 \pm 0,1 mm), parâmetro que também foi reduzido em 43% pelo tratamento com FII (1,6 \pm 0,2 mm). O controle de indometacina reduziu o edema articular em 30% (2,1 \pm 0,0 mm) (Figura 13B). Nesta mesma hora, zimosan causou influxo leucocitário, majoritariamente marcado por aumento de neutrófilos (57300 \pm 14659 células vs. salina: 79 \pm 44 células), que foi reduzido pela FII em 73% (15008 \pm 5794 células). O controle de indometacina reduziu o influxo celular em 85% (8411 \pm 2133 células) (Figura 13 C).

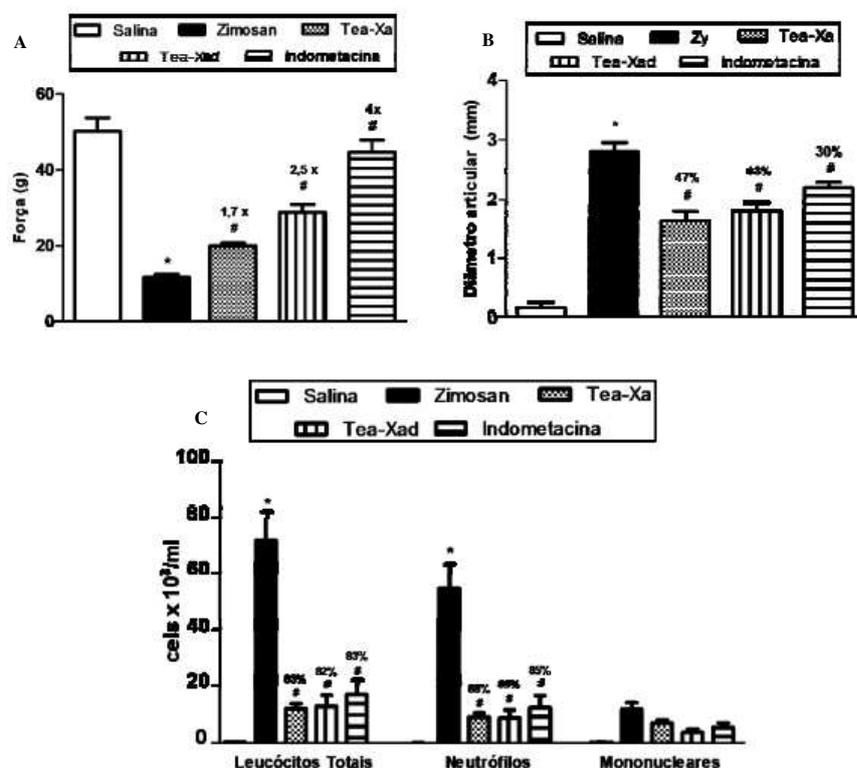
Figura 13. Efeito inibitório da fração FII desproteínada de *X. americana* sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan. Zimosan (500 μ g) foi administrado na articulação tíbio-tarsal de ratos 2 h antes do tratamento com FII (1 mg/kg; e. v.). O grupo controle recebeu salina estéril. Após 6 h, os animais foram eutanasiados para avaliação. (A) Hiperálgia; (B) Edema articular; (C) Infiltrado leucocitário. Média \pm EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni *p<0,05 vs.salina.#p<0,05 vs. zimosan.



5.5 Comparação do efeito inibitório do chá de *X. americana* após desproteíntização sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan em esquema de pós-tratamento

A injeção intra-articular de zimosan (500 μ g) reduziu o limiar nociceptivo em resposta a pressão aplicada na pata dos animais, avaliada 6 h após estimulação (11,6 \pm 0,8 g vs. salina: 50,2 \pm 3,4 g). O tratamento com o chá desproteíntizado de *X. americana* (Tea-Xa 1 mg/kg) aumentou o limiar nociceptivo dos animais em 2,5 x (20,0 \pm 0,7 g). O controle de indometacina aumentou o limiar dos animais em 4 x (44,5 \pm 3,1 g) (Figura 14A). Zimosan também provocou aumento do edema articular, comparado ao controle (2,8 \pm 0,1 mm vs. salina: 0,1 \pm 0,1 mm), parâmetro que também foi reduzido em 43% pelo tratamento com Tea-Xa (1,7 \pm 0,1 mm). O controle de indometacina reduziu o edema articular em 30% (2,1 \pm 0,0 mm) (Figura 14B). Nesta mesma hora, zimosan causou influxo leucocitário, majoritariamente marcado por aumento de neutrófilos (57300 \pm 14659 células vs. salina: 79 \pm 44 células), que foi reduzido pelo chá desproteíntizado em 85% (8602 \pm 2963 células). O controle de indometacina reduziu o influxo celular em 85% (8411 \pm 2133 células) (Figura 14C).

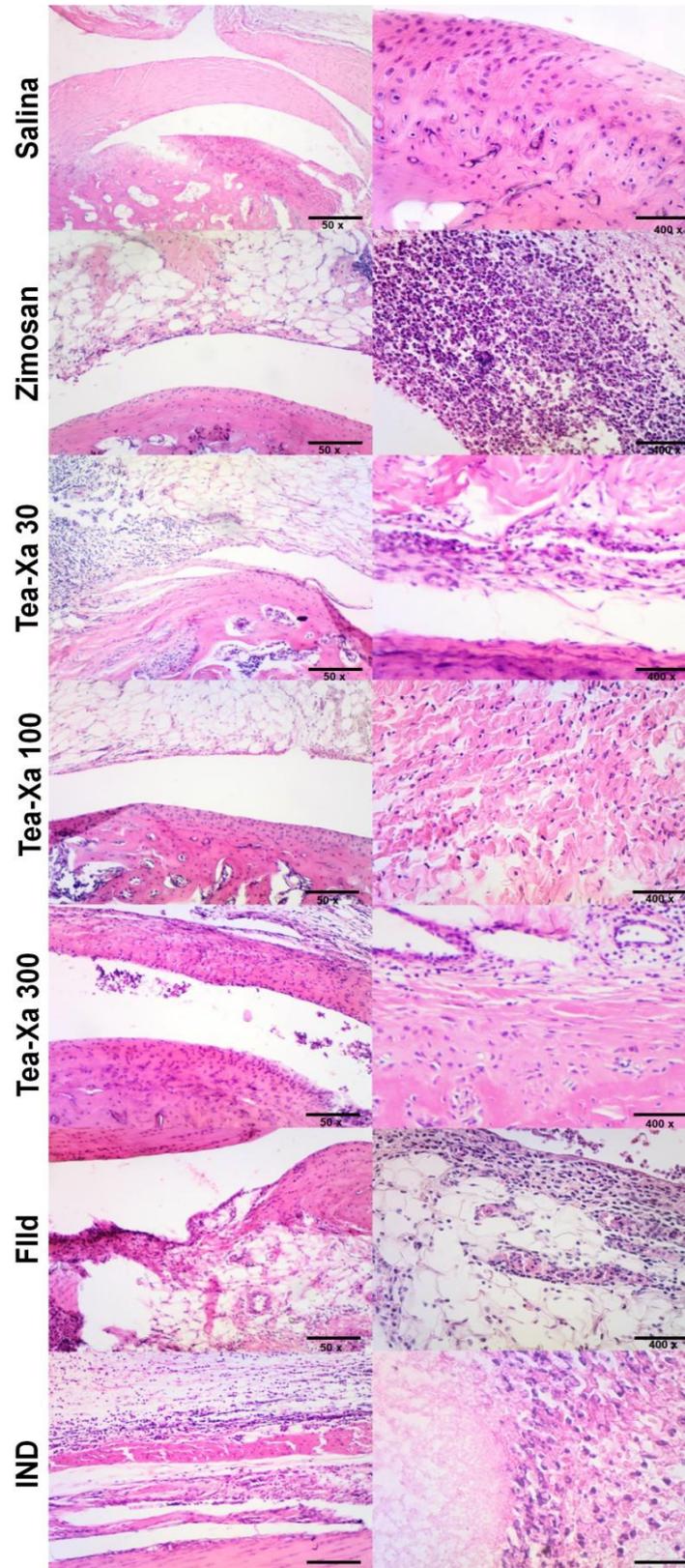
Figura 14. Efeito comparativo do chá de *X. americana* após desproteíntização sobre parâmetros inflamatórios da artrite induzida por zimosan. Zimosan (500 μ g) foi administrado na articulação tíbio-tarsal de ratos 2 h antes do tratamento com Tea-Xad (100 mg/kg; v.o.) ou com Tea-Xa (100 mg/kg; v.o.). O grupo controle recebeu salina estéril. Após 6 h, os animais foram eutanasiados para avaliação. (A) Hiperálgia; (B) Edema articular; (C) Infiltrado leucocitário. Média \pm EPM (n = 8). ANOVA e Bonferroni *p<0,05 vs.salina.#p<0,05 vs. zimosan. Tea-Xa: chá de *X. americana*. Tea-Xad: chá desproteíntizado.



5.6 O chá de *X. americana* e a fração FII reduzem infiltrado inflamatório, necrose e desorganização na superfície das articulações tíbio-tarsais de ratos com artrite induzida por zimosan.

O grupo salina apresentou articulações com condrócitos e condroblastos sem alterações microscópicas, organizados em uma superfície articular sobre a qual repousa disco articular composto por fibras colágenas dispostas longitudinalmente em direção pósterio-anterior. No grupo tratado com zimosan observou-se intenso infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear, com áreas de necrose, extensas zonas de edema e desorganização da superfície articular. O tratamento com Tea-Xa, na dose de 30 mg/kg, proporcionou discreta redução do infiltrado inflamatório, com zonas de edema notáveis, bem como desorganização morfológica da superfície articular. Nos grupos tratados com as doses de 100 e 300 mg/kg, houve redução significativa na intensidade do infiltrado polimorfonuclear. Apesar de sinais de edema, houve redução significativa da incidência de necrose tecidual e de desorganização as estruturas articulares. O grupo tratado com FIIId ainda apresentou infiltrado inflamatório polimorfonuclear, entretanto sem sinais de desorganização morfológica na maioria das amostras (apenas 1 amostra revelou pequeno foco de necrose tecidual). O grupo controle, tratado com indometacina apresentou a maior parte dos animais com intenso ou moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear, extensas faixas de necrose tecidual e de edema (Figura 15).

Figura 15. Avaliação histopatológica das articulações dos animais tratados com o chá e a fração FIId de *X. americana*. Após 6 h da administração de zimosan (500 μ g) e 4h do tratamento com Tea-Xa (30, 100 ou 300 mg/kg; v.o.) ou com FIId (1 mg/kg; e.v.), a articulação t bio-tarsal dos animais foi removida e fundida em blocos histológicos, seguido de colora o com H & E para análises microscópicas.



O tratamento com zimosan aumentou significativamente o infiltrado inflamatório polimorfonuclear ($p<0,001$), o edema ($p<0,001$) a necrose ($p=0,027$) e a desorganização tecidual ($p<0,001$). O tratamento com o chá de *X. americana* nas doses de 100 e 300 mg/kg reduziu significativamente a intensidade do infiltrado inflamatório ($p<0,001$), de necrose ($p=0,027$) e de desorganização tecidual ($p<0,001$). O tratamento com FIIId reduziu a necrose tecidual ($p=0,027$), ao passo que o tratamento com IND reduziu apenas a incidência de desorganização tecidual ($p<0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Análise histopatológica do perfil anti-inflamatório do chá e da fração FII desproteínada de *X. americana*

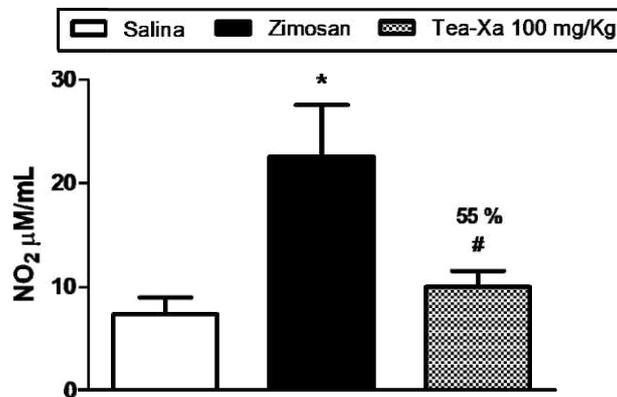
	Grupo							p-Valor
	Salina	Zimosan	Tea-Xa 30 mg/kg	Tea-Xa 100 mg/kg	Tea-Xa 300 mg/kg	FIIId	IND	
Perfil inflamatório								
Ausente	6 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	<0,001
Agudo	0 (0.0%)	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	5 (100.0%)*	5 (100.0%)*	
Crônico	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Escore inflamação								
Ausente	6 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	<0,001
Até 25 céls/campo	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (20.0%)*	
Entre 26 e 125 céls/campo	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)	3 (50.0%)*	5 (83.3%)*	1 (20.0%)	2 (40.0%)	
Mais de 125 céls/campo	0 (0.0%)	6 (100.0%)*	5 (83.3%)*	3 (50.0%)	1 (16.7%)	4 (80.0%)*	2 (40.0%)	
Necrose	0 (0.0%)	4 (66.7%)*	3 (50.0%)*	0 (0.0%) [†]	0 (0.0%) [†]	1 (20.0%)	2 (40.0%)*	0,027
Desorganização	0 (0.0%)	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	2 (33.3%) [†]	0 (0.0%) [†]	0 (0.0%) [†]	0 (0.0%) [†]	<0,001
Material endocitado	0 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	5 (100.0%)	5 (100.0%)	
Sinais de edema	0 (0.0%)	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	6 (100.0%)*	5 (100.0%)*	5 (100.0%)*	<0,001

* $p<0,05$ versus salina; [†] $p<0,05$, versus Zimosan; teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

5.7 O efeito inibitório do chá de *X. americana* ocorre via redução de nitrito

A injeção intra-articular de zimosan (500 μ g) aumentou os níveis de nitrito na articulação tíbio-tarsal dos animais 6 h após a estimulação ($22,5 \pm 4,9$ g vs. salina: $7,3 \pm 1,6$ μ M/ml). O grupo que recebeu o tratamento oral com o chá de *X. americana* (100 mg/kg) apresentou redução dos níveis de nitrito em 55% ($10,0 \pm 1,5$ g μ M/ml) (Figura 16).

Figura 16. O tratamento oral com o chá de *X. americana* reduz os níveis de nitrito nas articulações de ratos. Zimosan (500 μ g) foi administrado na articulação tibio-tarsal de ratos 2 h antes do tratamento com Tea-Xa (100 mg/kg; v. o.). O grupo controle recebeu salina estéril. Após 6 h, os animais foram eutanasiados para coleta do fluido sinovial e dosagem de nitrito (Método de Griess). Média \pm EPM (n = 6). ANOVA e Bonferroni * $p < 0,05$ vs. salina. # $p < 0,05$ vs. zimosan.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito inibitório do chá (decoção) e de uma fração polissacarídica desproteínada (FIId) obtidos da casca do caule de *Ximena americana* na artrite induzida por zimosan na articulação tíbio-tarsal de ratos, caracterizada por ativar eventos inflamatórios agudos, como a migração de neutrófilos, o edema e a hipernocicepção articular (GUERRERO et al., 2006; BRINGEL et al., 2020).

O chá (nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg) e a FIId foram administradas por via oral e endovenosa, respectivamente, 2 horas após a indução da artrite por zimosan (i.a.) e os parâmetros foram avaliados na 6ª hora após estimulação. O chá, na dose de 100 mg/kg e a FIId (1 mg/kg) reduziram todos parâmetros inflamatórios articulares induzidos por zimosan. Dados que compõem este estudo (capítulo 1), publicados recentemente, demonstraram previamente que o chá e as frações polissacarídicas obtidas da casca de *X. americana* diminuíram a intensidade dos parâmetros inflamatórios agudos induzidos por zimosan em camundongos (MARQUES et al., 2020). Embora tais efeitos já tenham sido reportados e nos tenham dado indícios destes resultados, nossos dados adicionam, de forma pioneira, o efeito anti-inflamatório desta planta em esquema de pós-tratamento, além do efeito proporcionado pelo pré-tratamento.

A literatura relata o efeito anti-inflamatório e antioxidante de várias plantas frente às inflamações articulares (DRAGOS et al., 2017). De forma mais específica, princípios ativos isolados de plantas medicinais conseguiram diminuir a severidade de inflamações articulares, de forma similar aos resultados aqui. A quercetina, em esquema de pré- tratamento, conseguiu diminuir o infiltrado leucocitário nas membranas sinoviais, além de edema articular e a hipernocicepção em camundongos após a indução de artrite aguda com zimosan (GUAZELLI et al., 2018). Já a curcumina, administrada oralmente e em esquema de pós-tratamento, assim como o protocolo utilizado neste trabalho, conseguiu diminuir a migração de neutrófilos em joelhos de ratos 6 horas após a indução com zimosan, não sustentando sua atividade inibitória 24 h pós indução (NONOSE et al., 2014).

Já é conhecido que o efeito inflamatório do zimosan sobre migração de neutrófilos permanece por até 14 dias após o estímulo da articulação (BRINGEL et al., 2020). De forma contrária ao encontrado por Nonose e colaboradores, nossos resultados mostraram que o tratamento com chá manteve o efeito anti-inflamatório sobre a migração de neutrófilos, mesmo após 24 horas da indução da artrite na articulação dos animais. Este fato pode ser

explicado pela presença de outras substâncias constituintes do chá, como os polifenóis e os polissacarídeos (MARQUES et al., 2020), já conhecidos na literatura por apresentar efeitos anti-inflamatório e anti-oxidante (XU et al., 2017; WANG et al., 2013; LI; SUN; HUANG, 2018). Trabalhos anteriores também ressaltam estes efeitos em processo inflamatórios em articulações. Um estudo recente demonstrou que o extrato aquoso das folhas de *Libidibia ferrea*, rico em polifenóis, apresentou atividade anti-oxidante e anti-inflamatória na inflamação articular em joelho de ratos, induzida por zimosan em ratos (FALCÃO et al., 2019). Vale ressaltar também que o chá das folhas de *Camellia sinensis* (chá preto indiano), rico em polifenóis, demonstrou redução de edema articular e de espécies reativas de oxigênio em modelos de inflamação aguda e crônica, incluindo a poliartrite (ROY et al., 2008).

Além da presença de polifenóis, as análises químicas revelaram alto teor de carboidratos na composição do chá e da fração polissacarídica FIId (MARQUES et al., 2020). Para investigar o efeito dos polissacarídeos sobre os parâmetros da artrite induzida por zimosan, os animais foram tratados com FIId 2 horas após a indução da artrite. Os resultados revelaram que, assim como o chá, o tratamento com a FIId também conseguiu inibir todos os parâmetros inflamatórios provocados por zimosan na articulação dos ratos, sugerindo uma importante participação dos polissacarídeos neste efeito. Nossos dados estão de acordo com trabalhos prévios que relataram este efeito de frações polissacarídicas de *X. americana* em processos inflamatórios e dolorosos (MARQUES et al., 2020; SILVA-LEITE et al., 2017, 2018; DA SILVA-PANTOJA et al., 2018). Também já foi demonstrado este efeito inibitório de polissacarídeos isolados em estudos com foco na inflamação articular. Um polissacarídeo isolado de *Ephedra sinica* inibiu parâmetros inflamatórios *in vivo*, como infiltrado celular e edema articular em artrite induzida por adjuvante em ratos (WANG et al., 2016). *In vitro*, polissacarídeos isolados da planta *Astragalus membranaceus* atenuam a produção de citocinas inflamatórias em cultura de sinoviócitos estimuladas com IL-1b (MENG et al., 2017). Adicionalmente, polissacarídeos oriundos da planta *Angelica sinensis* inibiram parâmetros de estresse oxidativo da osteoartrite, tais como MDA, peróxido de hidrogênio e NO em condrócitos humanos (ZHUANG et al., 2018).

De forma complementar à investigação do efeito dos polissacarídeos presentes no chá, um processo de desproteínização foi realizado no extrato e este foi administrado nos animais seguindo o mesmo esquema de tratamento esclarecido anteriormente. As análises dos dados mostraram que o tratamento dos animais com o chá desproteínado, contendo menor ou quase nenhum teor protéico, manteve ou aumentou a inibição dos parâmetros inflamatórios da artrite, fato similar ao que ocorreu no tratamento dos animais com a fração

desproteínada (FIId).

As análises histopatológicas das articulações confirmaram que o tratamento com o chá, nas doses de 100 e 300 mg/kg reduziram de forma significativa a intensidade do infiltrado neutrofílico. O grupo tratado com FIId também mostrou redução do infiltrado celular, mas de forma mais discreta, o que entra em concordância com a contagem celular do fluido sinovial, que revelou menor inibição de FIId no processo de migração celular, porém ainda muito significativa. Além disso, o chá nas doses de 100 e 300 mg/kg, também reduziram a necrose tecidual e a desorganização das estruturas articulares de forma significativa, porém sinais de edema ainda foram observados. No grupo tratado com FIId ainda foi observado infiltrado inflamatório e edema, porém não revelou desorganização estrutural das articulações. Estes aspectos também entram em consonância com os resultados observados na avaliação dos parâmetros anteriores. Trabalhos anteriores também mostraram o mesmo achado em análises histológicas para os tratamentos com princípios ativos isolados de plantas (NONOSE et al., 2014; GUAZELLI et al., 2018).

A literatura descreve o papel central do NO como uma das principais substâncias moduladoras da dor inflamatória na artrite reumatóide, atuando como sensibilizador dos nociceptores periféricos (SPILLER et al., 2019). Em modelos animais de inflamação articular induzidas por zimosan, também se confirma que o NO atua de forma importante e apresenta um papel dual (anti- ou nocicepção) na dor articular (ROCHA et al., 2002). O chá de *X. americana*, na dose de 100 mg/kg, reduziu de forma significativa os níveis de nitrito nas articulações inflamadas pelo zimosan, sugerindo que o este tratamento possa estar agindo na inibição da dor interferindo na via do NO. Entretanto, protocolos futuros mais específicos ainda precisam ser aplicados para a confirmação deste fato.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que o chá e a fração polissacarídica desproteinada (FIId), obtidos da casca do caule de *Ximenia americana* possuem efeito anti-inflamatório em modelo de artrite experimental induzida por zimosan na articulação tíbio-tarsal de ratos, através das reduções de: infiltrado neutrofílico, edema e hipernocicepção articular, nitrito. Esses efeitos podem ser importantes aliados para o tratamento combinado ou coadjuvante de *Ximenia americana* na inflamação articular.

CAPÍTULO III:

Estudo da toxicidade aguda do chá das cascas de *Ximenia americana* L.

1 INTRODUÇÃO

Há séculos as plantas medicinais são utilizadas como importante instrumento terapêutico pelo homem que, baseado no empirismo e em ensinamentos de gerações anteriores, seguiu implementando-as como tratamento na cura de doenças. Mesmo frente aos notáveis avanços da medicina moderna, continuam sendo utilizadas, estimando-se que originam cerca de 30% das drogas avaliadas com potencialidades terapêuticas (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A terapia alternativa, também conhecida como fitoterapia, tornou-se ímpar, sobretudo nos países subdesenvolvidos, por permitir a acessibilidade da população devido ao baixo custo envolvido. O Brasil é um país com vasto histórico no uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças da população. Portanto, o uso de chás, infusões, tinturas ou consumo oral *in natura* de plantas medicinais é bastante empregado devido a vários fatores que envolvem a diversidade da flora brasileira e sua biodisponibilidade, a dificuldade da população ao acesso à assistência médica e farmacêutica e ao amplo comércio em locais públicos, outro fator que facilita bastante o contato da população com essas alternativas (BRUNING et al., 2012).

Desde 1978, a OMS (Organização Mundial da Saúde) tem incentivado investimentos públicos para possibilitar o uso de plantas medicinais pela população. Em 2005, foi implantada a Política Nacional da Medicina Tradicional e Regulamentação de Medicamentos Fitoterápicos, que veio abranger as políticas necessárias à implantação da medicina tradicional em todos os seus países membros, inclusive no Brasil (BRASIL, 2006). A Farmácia Viva, instituída no Brasil no ano de 2008, prevê indicação segura do uso de várias plantas listadas pelo ministério da saúde, respaldada pelos resultados de pesquisas que avaliam o potencial tóxico e atividades biológicas dessas plantas. Sua criação se baseou na necessidade de ampliação da oferta de plantas medicinais/fitoterápicos que atendessem à demanda da população brasileira. Seguindo a política nacional de assistência farmacêutica, a Farmácia Viva realiza todas as etapas (cultivo à coleta, processamento, armazenamento de plantas medicinais, manipulação e dispensação) de preparações de plantas medicinais e fitoterápicos, os quais são prescritos por profissionais médicos e enfermeiros vinculados à Atenção Primária à Saúde (APS). É importante enfatizar que estes fitoterápicos aparecem como opção ao tratamento e busca da melhoria dos problemas de saúde. Nesse contexto, é necessário, por parte dos profissionais de saúde, a valorização e a importância da cultura popular, bem como a busca pelo conhecimento aprofundado da realidade em que a equipe

de saúde está inserida (SAMPAIO et al., 2013).

Apesar dos efeitos benéficos comprovados das plantas medicinais, apenas o conhecimento popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Dependendo da forma de utilização, os extratos vegetais têm potencial para provocar efeitos colaterais graves nos seres humanos, razão pela qual podem apresentar contra-indicações. O uso seguro de qualquer planta medicinal ou seus componentes requer testes de toxicidade. Atualmente, dispõe-se do protocolo recomendado pelas diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseado nas orientações da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), a qual estabelece parâmetros de avaliação em ensaios de produtos químicos (OECD, 2001). A descrição deste protocolo possibilitou além do desenvolvimento, o registro e a comercialização de fitoterápicos, legitimando assim a Fitoterapia como tratamento alternativo ou coadjuvante (FIGUEREDO et al., 2011).

Considerando este cenário, o estudo de eficácia e segurança de substâncias extraídas de plantas é fundamental, pois diversas pesquisas já demonstraram que seus constituintes, inclusive os polissacarídeos vegetais, presentes no chá de *Ximenia americana*, têm apresentado efeitos curativos promissores (WANG et al., 2011; ZHOU et al., 2010; CHEN; CHEN; QIN, 2011; PEREIRA et al., 2012a, 2012b; PEREIRA et al., 2016; SILVA-LEITE et al., 2018; MARQUES et al., 2020).

A planta *Ximenia americana* (família Olacaceae) é conhecida popularmente como ameixa brava, ameixa-brava-do-sertão ou ameixeira-do-Brasil (SOUZA; LORENZI, 2005). É um arbusto pequeno, de casca fina e avermelhada ou cinza, folhas pequenas e flores branco-amareladas. Seus frutos são aromáticos, do tipo drupa, de cor amarelo alaranjado. Várias partes desta planta são utilizadas para fins medicinais, entretanto, a casca do caule tem sido especificamente explorada popularmente para o tratamento de diversas doenças, como malária, dor de estômago, reumatismo, câncer, infecções na boca, lepra, dor de cabeça, infecções da pele, cicatrização, hemorroidas, inflamação de mucosas, dentre outros transtornos inflamatórios e/ou dolorosos (BRASILEIRO et al., 2008; MATOS, 2007; OGUNLEYE; IBITOYE, 2003; LE et al., 2012).

Estudos experimentais realizados com a *X. americana* demonstraram ação anti-inflamatória e antinociceptiva de seus extratos aquoso e hidroetanólico obtidos das raízes e das cascas do caule. Além disso, demonstraram DL50 de 354 mg/kg (extrato da raiz) e 219-237,5 mg/kg (extrato das cascas do caule) (OLABISSI et al., 2011; da SILVA et al., 2018; SORO; TRAORE; SAKANDE, 2009). Também foi demonstrada ação anti-inflamatória do chá e das frações polissacarídicas, obtidos das cascas do caule, em modelos clássicos de

inflamação aguda (MARQUES et al., 2020) e também em modelos de pancreatite e gastrite (SILVA-LEITE et al., 2018, SILVA PANTOJA et al., 2018). Entretanto, nenhum estudo relacionado à toxicidade decorrente da administração oral dos extratos obtidos da casca do caule de *X. americana*, parte da planta mais utilizada pela população, foi realizado.

Considerando que ensaios de toxicidade são subsídios importantes para estudos aprofundados do envolvimento de componentes oriundos de plantas em processos biológicos diversos, este trabalho buscou determinar uma faixa de segurança para o uso do chá obtido das cascas do caule de *Ximania americana*, avaliando os efeitos do tratamento por via oral em ratos, com vistas a uma possível implementação como terapia alternativa ou coadjuvante no tratamento de processos inflamatórios e dolorosos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a toxicidade sistêmica do chá das cascas do caule de *Ximenia americana* administrado por via oral em ratos em testes de toxicidade aguda.

2.2 Específicos

- a) Avaliar alterações sobre parâmetros hematológicos, histopatológicos e bioquímicos plasmáticos após 14 dias da administração chá;
- b) Avaliar alterações motoras e comportamentais por meio da realização do screening hipocrático de Malone por 14 dias consecutivos após a administração do chá de *X. americana*;
- c) Avaliar alterações na massa corporal e nos órgãos (cérebro, fígado, estômago, rins e baço) após 14 dias da administração do chá de *X. americana*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais e Terapia Fitoterápica

O uso de chás, infusões, tinturas ou consumo oral *in natura* de plantas medicinais é herdado historicamente pela população e tem papel importante na saúde global há séculos. Mesmo com os notáveis avanços da medicina moderna, as plantas medicinais continuam sendo utilizadas, estimando-se que cerca de 30% das drogas avaliadas com potencialidades terapêuticas derivam de produtos naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Estudos abordando a composição das plantas mostram a presença predominante de metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos e polifenóis. Estas substâncias conferem às plantas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-câncer, analgésica, anestésica, entre outras (SEN; SAMANTA, 2014). Entretanto, variações nos teores destas substâncias, ocasionadas por diversos fatores podem interferir diretamente nas atividades biológicas das plantas, o que reforça a necessidade de investigações científicas.

Uma planta é considerada medicinal quando aplicada por uma via de administração específica exerce ação terapêutica (MATTOS et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como principal fonte de tratamento (RAMAKRISHNAN et al., 2017). Este fato, estimulado por questões sócio-econômicos, vem contribuindo não só com a descoberta de novas substâncias, mas também com padronizações que garantam a sua utilização de forma segura (WHO, 2002; ZENI et al., 2017; SOUZA et al., 2013. TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2016).

Entretanto, é importante lembrar que, além dos constituintes que conferem efeitos benéficos, as plantas também contêm toxinas, podendo ou não apresentar efeitos tóxicos. Estas, se forem consumidas de forma prolongada ou inadequada, favorecem intoxicações, efeitos teratogênicos e abortivos ou até consequências mais severas, como complicações sérias em órgãos como o fígado e o rim. Algumas precauções devem ser tomadas antes mesmo do consumo, desde a obtenção até a fase de preparo, pois em todas estas etapas, principalmente na estocagem do material vegetal podem ocorrer contaminações que poderão contribuir de forma definitiva para a toxicidade da planta (VEIGA JUNIOR et al., 2005; PASSOS et al., 2018; FERREIRA; PINTO, 2010; CAMPOS et al., 2016).

A terapia alternativa ou tradicional, hoje conhecida como fitoterapia, vem

ganhando mais adeptos, principalmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a população tem dificuldade de acesso ao sistema público de saúde (ZHENG et al., 2013; EKOR, 2014; ROVEDDER et al., 2016). No Brasil esta prática terapêutica é bastante difundida não só pela questão da acessibilidade, mas pela diversidade cultural e saberes populares advindos dos povos indígenas e, de forma muito importante, devido à grande biodiversidade e biodisponibilidade da flora brasileira, que perfaz 25% de toda biodiversidade vegetal mundial (EVANGELISTA et al., 2013; MICHELON et al., 2016). O aumento constante da adesão ao consumo de produtos oriundos de plantas talvez também possa estar associado a conscientização sobre potenciais riscos do consumo abusivo de produtos farmacêuticos (reações adversas e tolerância medicamentosa), além dos relatos bem sucedidos do uso popular somados aos já reportados em estudos científicos, comprovando sua eficácia. Estimulados por estes fatores, os profissionais e pesquisadores da área da saúde recomendam e prescrevem a utilização de fitoterápicos como alternativa ou terapia combinada para prevenção e tratamento de doenças, sobretudo, pelo menor custo, fácil acesso e menores reações adversas.

Neste contexto, foram criados programas e políticas que abordam o uso de plantas medicinais e a fitoterapia em âmbito nacional. Em 2006, foi fundada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares para o SUS (PNPIC – Portaria 971/GM/MS). Essa política atende, sobretudo, à necessidade de conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, dentre as quais destacam-se a Medicina Tradicional Chinesa, Homeopatia, Fitoterapia, Medicina Antroposófica e Termalismo-Crenoterapia (TESSER; SOUSA; NASCIMENTO, 2018). Ainda em 2006, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto Nº 5.813, de 22/06/2006) que estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em âmbito nacional, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira.

Em 2009, o Ministério da Saúde publicou uma lista contendo plantas cuja utilização gera interesse ao SUS (Figura 17). É a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009). Tais iniciativas vêm possibilitando a realização de estudos, geração e implementação de medicamentos fitoterápicos, constituindo vantagens para a população, sobretudo às de baixa renda, pelo custo-benefício decorrente. Aqui não são contempladas todas as iniciativas desenvolvidas pelos governos em suas esferas, mas mostra-se os principais mecanismos envolvidos no uso

de plantas medicinais e fitoterapia que estão em desenvolvimento contínuo.

Figura 17. Relação de Plantas Mediciniais - RENISUS

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS	
Espécies vegetais	
1	<i>Achillea millefolium</i>
2	<i>Allium sativum</i>
3	<i>Aloe</i> spp* (<i>A. vera</i> ou <i>A. barbadensis</i>)
4	<i>Alpinia</i> spp* (<i>A. zerumbet</i> ou <i>A. speciosa</i>)
5	<i>Anacardium occidentale</i>
6	<i>Ananas comosus</i>
7	<i>Apuleia ferrea</i> = <i>Caesalpinia ferrea</i> *
8	<i>Arrabidaea chica</i>
9	<i>Artemisia absinthium</i>
10	<i>Baccharis trimera</i>
11	<i>Bauhinia</i> spp* (<i>B. affinis</i> , <i>B. forficata</i> ou <i>B. variegata</i>)
12	<i>Bidens pilosa</i>
13	<i>Calendula officinalis</i>
14	<i>Carapa guianensis</i>
15	<i>Casearia sylvestris</i>
16	<i>Chamomilla recutita</i> = <i>Matricaria chamomilla</i> = <i>Matricaria recutita</i>
17	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
18	<i>Copaifera</i> spp*
19	<i>Cordia</i> spp* (<i>C. curassavica</i> ou <i>C. verbenacea</i>)*
20	<i>Costus</i> spp* (<i>C. scaber</i> ou <i>C. spicatus</i>)
21	<i>Croton</i> spp (<i>C. cajucara</i> ou <i>C. zehntneri</i>)
22	<i>Curcuma longa</i>
25	<i>Eleutherine plicata</i>
26	<i>Equisetum arvense</i>
27	<i>Erythrina mulungu</i>
28	<i>Eucalyptus globulus</i>
29	<i>Eugenia uniflora</i> ou <i>Myrtus brasiliiana</i> *
30	<i>Foeniculum vulgare</i>
31	<i>Glycine max</i>
32	<i>Harpagophytum procumbens</i>
33	<i>Jatropha gossypifolia</i>
34	<i>Justicia pectoralis</i>
35	<i>Kalanchoe pinnata</i> = <i>Bryophyllum calycinum</i> *
36	<i>Lamium album</i>
37	<i>Lippia sidoides</i>
38	<i>Malva sylvestris</i>
39	<i>Maytenus</i> spp* (<i>M. aquifolium</i> ou <i>M. ilicifolia</i>)
40	<i>Mentha pulegium</i>
41	<i>Mentha</i> spp* (<i>M. crisper</i> , <i>M. piperita</i> ou <i>M. villosa</i>)
42	<i>Mikania</i> spp* (<i>M. glomerata</i> ou <i>M. laevigata</i>)
43	<i>Momordica charantia</i>
44	<i>Morus</i> sp*
45	<i>Ocimum gratissimum</i>
46	<i>Orbignya speciosa</i>
47	<i>Passiflora</i> spp* (<i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> ou <i>P. incarnata</i>)
48	<i>Persea</i> spp* (<i>P. gratissima</i> ou <i>P. americana</i>)
49	<i>Petroselinum sativum</i>
50	<i>Phyllanthus</i> spp* (<i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. tenellus</i> e <i>P. urinaria</i>)
51	<i>Plantago major</i>
52	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>
53	<i>Polygonum</i> spp* (<i>P. acre</i> ou <i>P. hydropiperoides</i>)
54	<i>Portulaca pilosa</i>
55	<i>Psidium guajava</i>
56	<i>Punica granatum</i>
57	<i>Rhamnus purshiana</i>
58	<i>Ruta graveolens</i>
61	<i>Solanum paniculatum</i>
62	<i>Solidago microglossa</i>
63	<i>Stryphnodendron adstringens</i> = <i>Stryphnodendron barbatimam</i>
64	<i>Syzygium</i> spp* (<i>S. jambolanum</i> ou <i>S. cumini</i>)
65	<i>Tabebuia avellanedeae</i>
66	<i>Tagetes minuta</i>
67	<i>Trifolium pratense</i>
68	<i>Uncaria tomentosa</i>
69	<i>Vernonia condensata</i>
70	<i>Vernonia</i> spp* (<i>V. ruficoma</i> ou <i>V. polyanthes</i>)
71	<i>Zingiber officinale</i>

* definir a(s) espécie(s) com cultivo, estudos e indicação de uso

Fonte: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/http://portalarquivos2.saude.gov.br/>

3.2 Ensaios de toxicidade

Toxicologia é a ciência que investiga a ocorrência de efeitos danosos originados a partir da exposição, em condições específicas, do organismo à xenobióticos (HODGSON, 2004). De uma maneira mais específica, a toxicologia visa avaliar as lesões causadas no

organismo por agentes tóxicos, investigar os mecanismos, identificar e quantificar as substâncias tóxicas presentes nos fluidos biológicos, bem como determinar seus níveis toleráveis no organismo (PASSAGLI, 2012).

A toxicidade é a ferramenta de estudo da toxicologia e refere-se à capacidade de uma substância causar efeitos adversos a um organismo, quando este é exposto a tal. A avaliação da toxicidade tem como objetivo caracterizar estes efeitos, para que haja uma regulamentação do uso da substância em questão (MEYER, 2003). Os testes toxicológicos podem abranger vários aspectos e a decisão de utilização vai depender do objetivo do estudo. Estes podem incluir toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (SPIELMANN, 2002; BARROS; DAVINO, 2003).

Utiliza-se com bastante frequência modelos animais para estudos toxicológicos, pois estes permitem mapear os efeitos de determinadas substâncias em seres humanos (BARROS; DAVINO, 2003). No contexto da fitoterapia estes estudos são considerados indispensáveis, pois além de avaliar o uso seguro, impulsionam e estimulam novas pesquisas para validação do uso popular pela possibilidade de seleção prévia de espécies que apresentam resultados mais significativos. As observações comportamentais dos animais fornecem uma estimativa geral da toxicidade da substância no sistema nervoso central, avaliando parâmetros como: atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, diversas atividades do sistema nervoso central e disposição geral (MALONE; ROBICHAUD, 1983). De acordo com protocolo padrão para observação dos parâmetros de comportamento, é possível definir dosagens intermediárias as usadas no teste de atividade farmacológica para avaliação de toxicidade subcrônica.

A diretriz 423 da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) determina os parâmetros dos testes para toxicidade aguda, que define os efeitos adversos ocorrentes em um período curto após a administração de uma dose única ou de doses múltiplas durante 24 horas no animal. Geralmente, a dose única é utilizada para avaliar os efeitos da substância nos casos acidentais (ingestão ou envenenamento) e as doses múltiplas para avaliar efeitos de acúmulo, utilizando a via oral como escolha (OECD 423, 2001).

3.3 *Ximenia americana*

A planta medicinal *Ximenia americana* L. (Família Olacaceae) é popularmente conhecida como ameixa brava, ameixa-brava-do-sertão, ameixa-do-norte, ameixeira-do-Brasil (LE et al., 2012). Caracterizam-se como arbustos pequenos, de casca fina, avermelhada ou cinza, folhas pequenas e flores branco-amareladas. Seus frutos são aromáticos, do tipo drupa, de cor amarelo alaranjado.

Várias partes da planta *X. americana* são utilizadas para fins medicinais, entretanto, a casca do caule tem sido especificamente explorada pela população para o tratamento de diversas doenças, como malária, dor de estômago, reumatismo, câncer, infecções na boca, lepra, dor de cabeça, infecções da pele, cicatrização, hemorroidas, inflamação de mucosas, dentre outros transtornos inflamatórios e/ou dolorosos (BRASILEIRO et al., 2008.; MATOS, 2007; OGUNLEYE; IBITOYE, 2003.; LE et al., 2012)

É importante destacar que a literatura relata efeitos biológicos importantes desta planta. Estudos realizados com a *Ximenia americana* demonstraram ação anti-inflamatória dos extratos aquoso e hidroetanólico das cascas em modelos de inflamação aguda e crônica (OLABISSI et al., 2011; SILVA et al., 2018). Foi demonstrada ação antinociceptiva do extrato aquoso das cascas (SORO; TRAORE; SAKANDE, 2009) e das frações polissacarídicas em modelo de inflamação mimetizando clinicamente o quadro de pancreatite (SILVA-LEITE et al., 2018). Além disso, o tratamento oral com o chá, produzido por decocção a partir das cascas do caule, reduziu parâmetros inflamatórios no modelo de gastrite experimental (SILVA PANTOJA et al., 2018) e em modelos clássicos de inflamação aguda (MARQUES et al., 2020).

Apesar do vasto uso popular e dos registros da literatura acerca de suas potencialidades farmacológicas, há escassez de estudos relacionados à toxicidade dos extratos e do chá obtidos da casca do caule de *X. americana* administrados por via oral em ratos. Desta forma, faz-se necessário estabelecer parâmetros de segurança e testes de toxicidade, visto que são subsídios importantes para estudos aprofundados do envolvimento desses compostos em processos biológicos diversos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, oriundas do Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), mantidos em temperatura controlada ($26 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 h, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram adaptados ao ambiente de laboratório durante um período mínimo de uma hora antes dos testes e foram manipulados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal da UECE (CEUA/UECE N° 4153018/2018).

4.2 Obtenção do chá de *Ximenia americana*

A planta foi coletada no município de Custódio (Quixadá – CE) e sua exsicata encontra-se depositada na FECLESC/Quixadá e no Herbário Prisco Bezerra (UFC) n° 46794.

O chá das cascas do caule de *X. americana* foi obtido por decocção em água destilada ($100^\circ \text{C}/5 \text{ min}$) e liofilizado para a utilização nos testes animais.

4.3 Desenho experimental

Esta investigação baseou-se nas orientações do guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA e nas recomendações presentes nas diretrizes 423 (toxicidade aguda) da OECD.

Os animais (n=9) foram submetidos a um período de jejum de duas horas antes da administração oral do chá de *X. americana*. Após essa etapa, os animais permaneceram em jejum por mais duas horas, para evitar alterações na absorção. Os animais foram divididos em três grupos que receberam por via oral (gavagem): salina; chá de *X. americana* (300 mg/kg); chá de *X. americana* (2000 mg/kg). No primeiro dia, os animais foram observados durante as primeiras quatro horas, e, posteriormente, uma vez ao dia durante quatorze dias consecutivos.

Ao longo dos 14 dias de observação foram feitas as seguintes avaliações:

intensidade dos sinais de toxicidade (escala de triagem hipocrática de Malone), mensuração do peso corpóreo (primeiro, sétimo dia e décimo quarto dia de observação), teste de campo aberto durante 60 minutos (sete e quatorze dias após a administração). Além disso, os animais foram observados individualmente durante 30 minutos diariamente, para o monitoramento de reações tóxicas e os tempos de início e duração do período de recuperação. Todas as observações foram registradas em uma ficha individual padronizada para cada animal.

No décimo quarto dia de avaliação, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e dos órgãos(cérebro, fígado, estômago, rim e baço) para realização de análises hematológicas, bioquímicas do plasma e histopatológicas.

4.4 Avaliação da atividade exploratória

Os animais foram alocados no campo aberto (estrutura transparente, feita de acrílico, com paredes transparentes e piso preto com 100 x 50 x 90 cm, dividido em nove quadrantes de iguais dimensões) para observação e registro dos parâmetros durante 5 minutos, após 1 minuto de ambientação. Os parâmetros observados foram: número de cruzamentos pelos quadrantes com as quatro patas (“movimentação espontânea”), número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e número de elevações sobre duas patas sem apoiar-se nas paredes do assoalho (*rearing*).

4.5 Avaliação da toxicidade do Sistema Nervoso

Nas avaliações diárias, foram observados sinais de toxicidade que configuram alterações no sistema nervoso autônomo (SNA): diminuição da frequência respiratória, excreção fecal, diarreia, sialorreia, diurese, lacrimação e cianose; alterações no sistema nervoso central (SNC): autolimpeza, movimentos estereotipados, agitação, reação de fuga, catatonía, tremores e convulsão; e da atividade somatossensorial: padrões de atividade locomotora, comportamento de lambar patas, movimento de vibrissas, marcha alterada, prostração, exoftalmia, sedação e analgesia.

Os eventos foram mensurados quanto ao tempo de início, intensidade, duração e progressão, e classificados em uma escala, seguindo os escores: 0 (ausente), 1 (raro), 2 (discreto), 3 (moderado) e 4 (intenso) (MALONE; ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1977).

4.6 Avaliação hematológica

No 14º dia, o sangue dos animais foi coletado em capilares sanguíneos e acondicionado em tubos contendo anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos ou em tubos sem anticoagulante e com gel separador, para obter o plasma sanguíneo utilizado na avaliação dos parâmetros bioquímicos.

O material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para as análises bioquímicas, que incluíram a quantificação de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, glicose e uréia por métodos bioquímicos, utilizando kits da Labtest.

Para análise do leucograma, o material foi corado com May-GrunwaldGiemsa e os valores quantificados para contagem total de linfócitos (LYM), células médias (monócitos, basófilos e eosinófilos – MID), leucócitos (WBC), granulócitos (GRA) e porcentagem de granulócitos (GR%), células médias (MID%), e linfócitos (LY%). Também foram quantificados os eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (MVC), hemoglobina, hematócrito, concentração de hemoglobina corpuscular (MCHC), hemoglobina corpuscular média (MCH) e distribuição de células vermelhas (RDwc).

Os valores foram determinados 24 horas após a coleta. A contagem de plaquetas (PLT), porcentagem de plaquetas (PCT%), volume médio de plaquetas (MPV) e sua distribuição também foram determinados em analisador hematológico celular automático (SDH-3, Labtest).

4.7 Análise histopatológica dos órgãos

No 14º dia, ao final das avaliações os órgãos (cérebro, fígado, estômago, rins e baço) foram removidos, fixados em formol a 10% e mantidos em álcool a 70%. Em seguida, foram desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados em xilol, impregnados em parafina fundida a 60 °C, formando blocos à temperatura ambiente. Segmentos de 5 µm de espessura foram seccionados, utilizando o micrótomo e depois corado em hematoxilina e eosina (HE) (Adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Os parâmetros avaliados por microscopia óptica foram: arquitetura padrão do tecido de cada órgão, presença de edema, presença de células inflamatórias, necrose e hemorragia.

4.8 Análise de massa relativa dos órgãos e peso corporal

Os animais foram pesados antes da administração do chá, no sétimo e no décimo quarto dias para determinar possíveis alterações de peso. Após eutanásia, o cérebro, fígado, estômago, rins e o baço foram retirados e pesados. O cálculo da massa relativa dos órgãos de cada animal foi realizado no dia da coleta, dividindo-se o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal de cada animal e multiplicando-se o resultado por 100. O resultado foi expresso em g/100 g de peso vivo (g/100g p.v.).

4.9 Análise estatística

As diferenças entre os dados obtidos para os grupos (dados não paramétricos) foram avaliadas por meio de teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os resultados foram expressos em gráficos e tabelas apresentados como média (\pm) e erro padrão da média (E.P.M). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ para todas as análises. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software Prisma versão 5.03 da GraphPad Software.

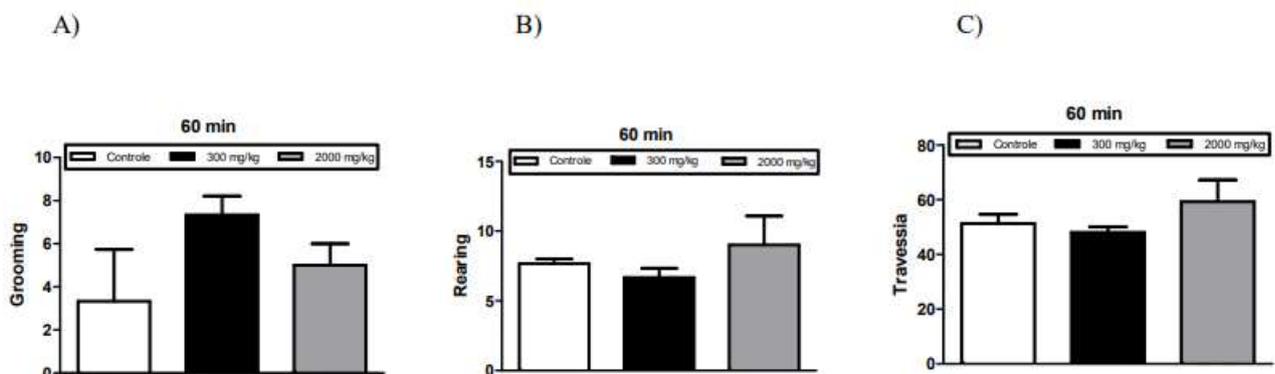
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação de sinais de toxicidade

5.1.1 Efeito do tratamento com o chá de *X. americana* na atividade exploratória

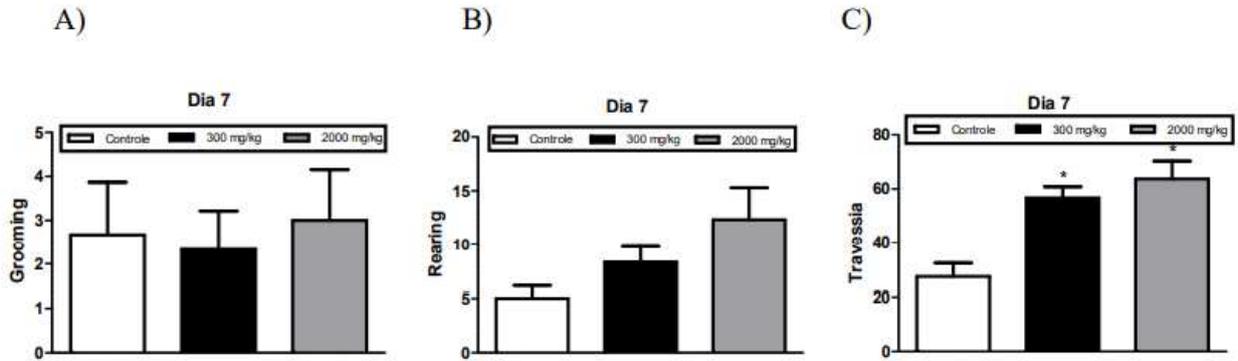
A avaliação do teste de campo aberto demonstrou uma tendência ao aumento do comportamento de autolimpeza do grupo que recebeu o chá na dose de 300 mg/kg, entretanto, não houve diferença estatística quando comparado ao controle (Figura 18 A). Além disso, o grupo tratado com a dose de 2000 mg/kg, também mostrou uma leve tendência a aumentar o número de elevações e travessias, porém, não significativa quando comparada ao controle (Figura 18 B e 18 C).

Figura 18. Efeito do tratamento do chá das cascas de *X. americana* sobre a atividade exploratória 60 minutos após administração. Ratos foram tratados com o chá (300 e 2000 mg/kg; via oral). 60 minutos depois, os comportamentos foram observados e registrados (durante 5 minutos): A) número de autolimpezas; B) número de elevações; C) número de travessias. Média \pm EPM (n = 3). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.



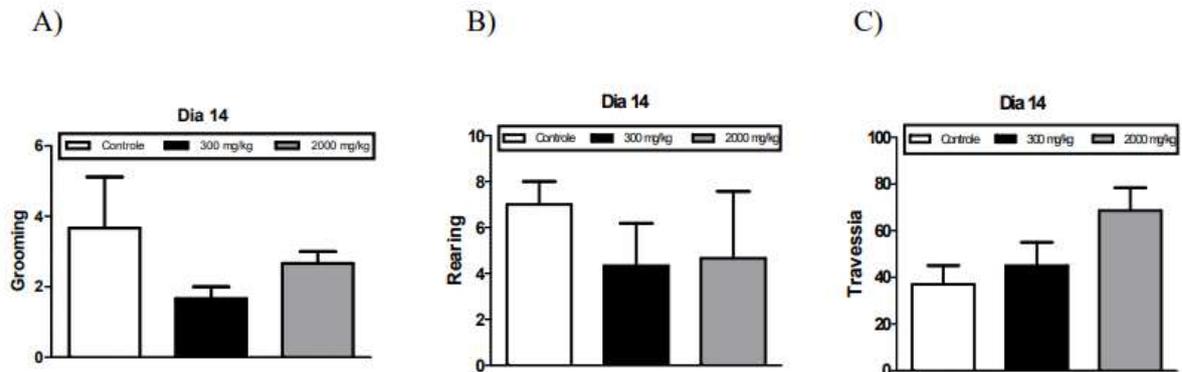
Na avaliação realizada no sétimo dia não foram observadas alterações do comportamento de autolimpeza entre os grupos tratados (Figura 19 A). Os grupos que receberam as doses de 300 e 2000 mg/kg, apresentaram tendência ao aumento no número de elevações quando comparados ao controle (Figura 19 B). Já no número de travessias, os tratamentos nas doses de 300 e 2000 mg/kg mostraram aumento significativo comparado ao controle (Figura 19 C).

Figura 19. Efeito do tratamento do chá das cascas de *X. americana* sobre a atividade exploratória 7 dias após administração. Ratos foram tratados com o chá (300 e 2000 mg/kg; via oral). 7 dias depois, os comportamentos foram observados e registrados (durante 5 minutos): A) número de autolimpezas; B) número de elevações; C) número de travessias. Média \pm EPM (n = 3). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.



A avaliação realizada no décimo quarto dia revelou uma tendência à redução no comportamento de autolimpeza nas duas doses testadas (Figura 20A). O número de elevações também foi reduzido quando comparadas as doses de 300 e 2000 mg/kg ao grupo controle (Figura 20 B), entretanto, sem alterações significativas. O número de travessias na dose de 2000 mg/kg apresentou tendência ao aumento quando comparado ao grupo controle, sem significância (Figura 20 C).

Figura 20. Efeito do tratamento do chá das cascas de *X. americana* sobre a atividade exploratória 14 dias após administração. Ratos foram tratados com o chá (300 e 2000 mg/kg; via oral). 14 dias depois, os comportamentos foram observados e registrados (durante 5 minutos): A) número de autolimpezas; B) número de elevações; C) número de travessias. Média \pm EPM (n = 3). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.



5.2 Screening hipocrático de Malone

5.2.1 Efeitos do tratamento com o chá de *X. americana* no Sistema Nervoso Central

Após a administração oral do chá de *X. americana*, a escala do screening hipocrático de Malone demonstrou discreto aumento em parâmetros relacionados ao comportamento de autolimpeza nos primeiros 60 minutos após administração do chá e se mantiveram constantes por todo o período de avaliação (14 dias). Entretanto, este achado foi observado em todos os grupos (controle e tratados), o que não configurou uma diferença significativa que pudesse ser relacionada ao tratamento com o chá. (Tabela 3).

5.2.2 Efeito do tratamento com o chá de *X. americana* no Sistema Nervoso Autônomo

A observação dos parâmetros relacionados ao SNA evidenciou discreta alteração sobre o parâmetro de excreção fecal, sobretudo na dose de 300 mg/kg, comparado ao controle. Não foram observadas outras alterações relacionadas aos demais parâmetros, o que sugere que o chá de *X. americana* não tem ação direta sobre o SNA (Tabela 4).

5.2.3 Efeito do tratamento com o chá de *X. americana* no Sistema Somatossensorial

As pontuações obtidas na avaliação evidenciam algumas alterações relacionadas ao comportamento de lambem patas e movimentação de vibrissas, quando comparados ao grupo controle. Tais sinais foram observados nos primeiros 60 minutos após a administração do chá e permaneceram até o final da avaliação. Entretanto, não foram observadas sedação, analgesia ou alterações de marcha nos animais tratados com o chá de *X. americana* (Tabela 5).

Tabela 3. Efeitos do chá de *X. americana* no SNC

Parâmetros	Grupo (n=3)	Tempo (min)				Tempo (dias)													
		60	120	180	240	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Autolimpeza	Controle	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	0	2	1	
	300	1	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	2	1	0	2	2	1	1
	2000	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1
Estereotipação	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agitação	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reação (fuga)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catatonía	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremores finos	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloereção	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pontuação: 0 (ausente), 1 (raro), 2 (discreto), 3 (moderado) e 4 (intenso). Dados representam o escore mediano de cada grupo.

Tabela 4. Efeito do chá de *X. americana* no Sistema Nervoso Autônomo

Parâmetros	Grupo (n=3)	Tempo (horas)				Tempo (dias)													
		60	120	180	240	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
↑Freq. Respiratória	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
↓ Freq. Respiratória	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Excreção Fecal	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarréia	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diurese	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sialorreia	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cianose	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pontuação: 0 (ausente), 1 (raro), 2 (discreto), 3 (moderado) e 4 (intenso). Dados representam o escore mediano de cada grupo.

Tabela 5. Efeito do chá de *X. americana* no sistema somatossensorial

Parâmetros	Grupo (n=3)	Tempo (horas)					Tempo (dias)													
		60	120	180	240	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Lamber patas	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	300	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	1	2	2	2	
	2000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
Elevação de cauda	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Movimento de vibrissas	Controle	2	2	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2	3	3	2	2	3	2	
	300	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	
	2000	2	2	3	2	2	2	3	2	3	2	3	2	2	3	2	3	3	3	
Alteração de marcha	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Prostração	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Exoftalmia	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sedação	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Analgésia	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Pontuação: 0 (ausente), 1 (raro), 2 (discreto), 3 (moderado) e 4 (intenso). Dados representam o escore mediano de cada grupo.

5.3 Análise hematológica

As avaliações dos padrões sanguíneos, realizadas após o décimo quarto dia da administração do chá de *X. americana* nos animais, revelaram aumento significativo do número total de leucócitos (controle: $4,38 \pm 1,22$; 300 mg/kg: $9,20 \pm 1,83$; 2000 mg/kg: $20,55 \pm 9,53$) e de linfócitos (controle: $3,59 \pm 1,06$; 300 mg/kg: $8,31 \pm 1,63$; 2000 mg/kg: $11,06 \pm 3,38$). Outros parâmetros não foram alterados pelo tratamento (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito do chá de *X. americana* sobre parâmetros hematológicos

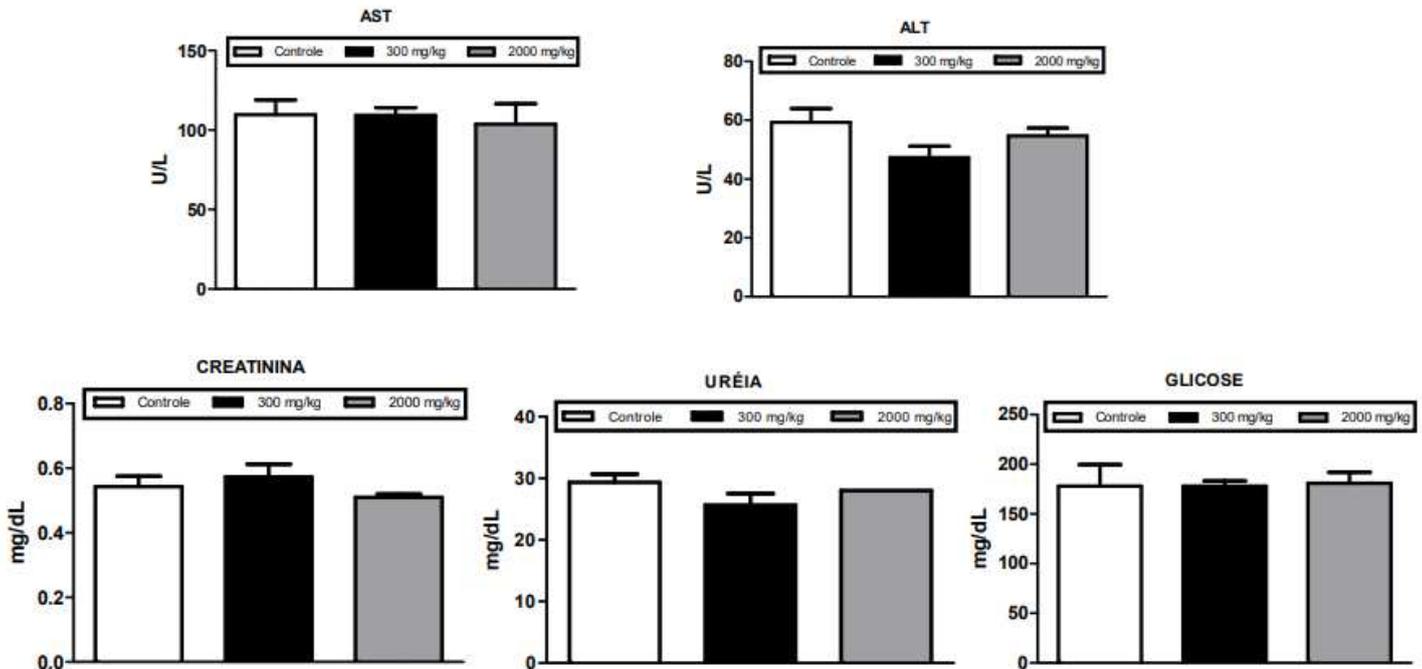
Hemograma	Controle	Chá de <i>X. americana</i> (300 mg/kg)	Chá de <i>X. americana</i> (2000 mg/kg)
Hemácias (10^6 /mm ³)	$5,37 \pm 0,65$	$8,26 \pm 0,11$	$6,59 \pm 1,41$
Hemoglobina (g/dL)	$9,36 \pm 1,58$	$13,67 \pm 0,17$	$13,43 \pm 0,33$
Hematócrito (%)	$36,34 \pm 4,15$	$53,40 \pm 1,64$	$42,91 \pm 8,42$
Volume Corpuscular Médio (μ)	$68,0 \pm 1,00$	$64,67 \pm 1,20$	$65,67 \pm 1,76$
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	$1,76 \pm 1,35$	$16,57 \pm 0,42$	$23,33 \pm 6,98$
Concentração de Hemoglobina Corpuscular (g/dl)	$25,50 \pm 1,90$	$25,70 \pm 1,01$	$35,03 \pm 9,48$
Distribuição de Células Vermelhas (%)	$13,57 \pm 0,58$	$13,33 \pm 0,26$	$15,93 \pm 1,38$
Leucograma			
Total de leucócitos	$4,38 \pm 1,22$	$9,20 \pm 1,83^*$	$20,55 \pm 9,53^*$
Total de linfócitos	$3,59 \pm 1,06$	$8,31 \pm 1,63^*$	$11,06 \pm 3,38^*$
Contagem Total (Monócitos, basófilos e eosinófilos).	$2,23 \pm 1,63$	$2,96 \pm 0,58$	$4,20 \pm 2,08$
Total de Granulócitos (mg/dL)	$0,68 \pm 0,21$	$0,59 \pm 0,11$	$8,91 \pm 6,28$
Linfócitos (%)	$2,23 \pm 1,63$	$2,96 \pm 0,58$	$4,20 \pm 2,08$
Células Médias (%)	$0,10 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,27$
Granulócitos (%)	$15,73 \pm 2,60$	$6,50 \pm 0,56$	$33,40 \pm 10,74$
Plaquetograma			
Contagem total de plaquetas	$511,7 \pm 161,3$	$871,3 \pm 146,39$	$580,3 \pm 90,64$
Plaquetas (%)	$0,26 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,04$
Volume Médio de Plaquetas (μ)	$5,33 \pm 0,29$	$5,76 \pm 0,08$	$5,40 \pm 0,10$
Distribuição de Plaquetas (%)	$27,17 \pm 0,77$	$28,87 \pm 0,50$	$27,43 \pm 0,46$

Média \pm EPM (n= 3). *p<0.05 vs. controle(salina). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Células Médias: Monócitos, basófilos e eosinófilos.

Quatorze dias após a administração do chá de *X. americana*, os parâmetros bioquímicos plasmáticos dos animais não mostraram diferenças significativas quanto as concentrações de glicose, AST, ALT, creatinina e uréia, o que significa que o tratamento não

alterou das funções hepáticas e renais (Figura 21).

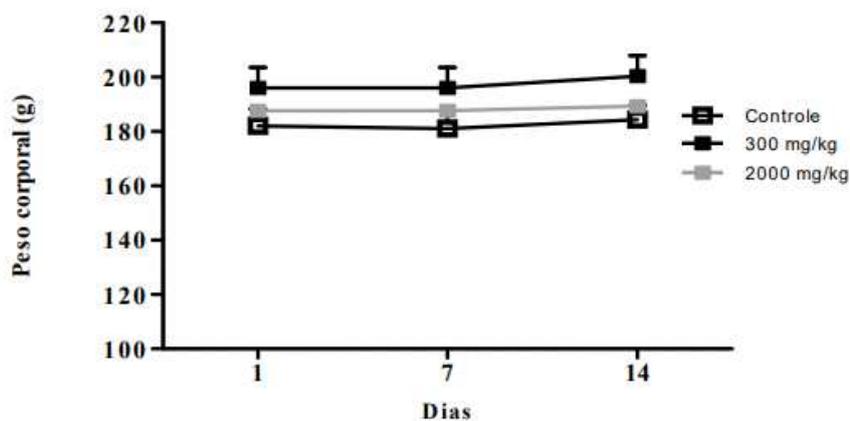
Figura 21. Efeito do tratamento do chá das cascas de *X. americana* sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos 14 dias após administração. Ratos foram tratados com o chá (300 e 2000 mg/kg; via oral). 14 dias depois, o sangue foi coletado para a quantificação dos parâmetros bioquímicos. * **ALT**: Alanina aminotransferase; **AST**: Aspartatoaminotransferase. Média \pm EPM (n=3). One-way ANOVA, teste de Bonferroni.



5.4 Efeito do tratamento com o chá de *X. americana* sobre o peso corporal e massa relativa dos órgãos.

Os animais tratados com o chá nas doses de 300 e 2000 mg/kg apresentaram discreta alteração do peso com tendência ao aumento, porém sem significância estatística quando comparados ao grupo controle (Figura 22).

Figura 22. Massa corporal dos animais tratados com o chá de *X. americana*. Os animais foram pesados antes da administração do chá e após o sétimo e décimo quarto dias. Média \pm EPM (n= 3). Teste de Kruskal- Wallis e pós-teste de Dunn.



A análise de massa relativa dos órgãos revelou que a administração do chá de *X. americana* na dose de 2000 mg/kg ocasionou aumento significativo da massa relativa dos rins ($3,05 \pm 1,77$ vs. salina: $1,26 \pm 0,15$ g/100g p.v.) (Tabela 7).

Tabela 7 – Massa relativa dos órgãos dos animais tratados com o chá de *X. americana*

GRUPO	Cérebro	Fígado	Estômago	Rim	Baço
Controle	$1,96 \pm 0,04$	$6,76 \pm 0,34$	$2,84 \pm 0,20$	$1,26 \pm 0,15$	$0,50 \pm 0,02$
300mg/kg	$2,02 \pm 0,03$	$6,17 \pm 0,46$	$2,16 \pm 0,29$	$1,45 \pm 0,12$	$0,56 \pm 0,01$
2000mg/kg	$2,0 \pm 0,10$	$4,45 \pm 1,45$	$3,09 \pm 0,84$	$3,05 \pm 1,77$	$0,59 \pm 0,05$

Média \pm EPM (n= 3). Análise estatística realizada por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. *p<0.05 vs. salina.

5.5 Análise histopatológica dos órgãos

5.5.1 Estômago

O estômago dos animais de todos os grupos apresentaram cárdia com epitélio de revestimento ceratinizado e fundo com glândulas mucosas e células principais e parietais dispostas na região fúndica. Um discreto adedelhamento do epitélio queratinizado foi observado nos grupos tratados com o chá nas doses de 300 e 2000 mg/kg. Não foram observados vasos ectásicos, hemorragia ou células inflamatórias no tecido conjuntivo submucoso. Ocasionalmente, eosinófilos subepiteliais podiam ser observados, mas em todos os grupos (Figura 23/Tabela 8).

Figura 23. Análise histopatológica do estômago. No 14º dia das avaliações, o estômago dos animais foi coletado e processado em bloco histológicos. Segmentos de 5 µm foram seccionado e corados (H & E) para análises microscópicas de: arquitetura do tecido, edema, infiltrado celular, necrose e hemorragia.

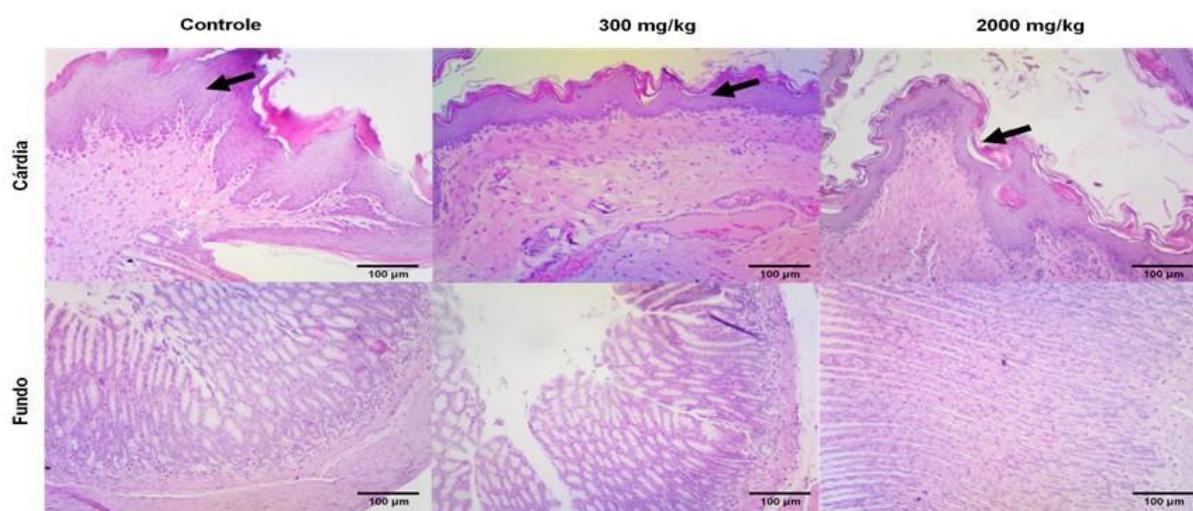


Tabela 8. Escores da análise de histopatológica do estômago

Grupo	Epitélio de revestimento ceratinizado (cárdia)	Glândulas mucosas/ cels		
		principais e parietais na região fúndica	Presença de vasos ectásicos / hemorragia	Presença de focos inflamatórios
Salina 1	+	+	-	-
Salina 2	+	+	-	-
Salina 3	+	+	-	-
Chá 300 mg/kg	+	+	-	-
Chá 300 mg/kg	+	+	-	-
Chá 300 mg/kg	+	+	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	-	-

5.5.2 Baço

As amostras de baço de todos animais apresentaram folículos bem formados e preservados, polpas brancas hiperplásicas e organizadas, bem como congestão da polpa vermelha e hemorragia. Não foram observados megacariócitos e apenas um animal do grupo tratado com 300mg/kg apresentou ocasionais pigmentos de hemossiderina (Figura 24/Tabela 9).

Figura 24. Análise histopatológica do baço. No 14º dia das avaliações, o baço dos animais foi coletado e processado em bloco histológicos. Segmentos de 5 µm foram seccionado e corados (H & E) para análises microscópicas de: arquitetura do tecido, edema, infiltrado celular, necrose e hemorragia.

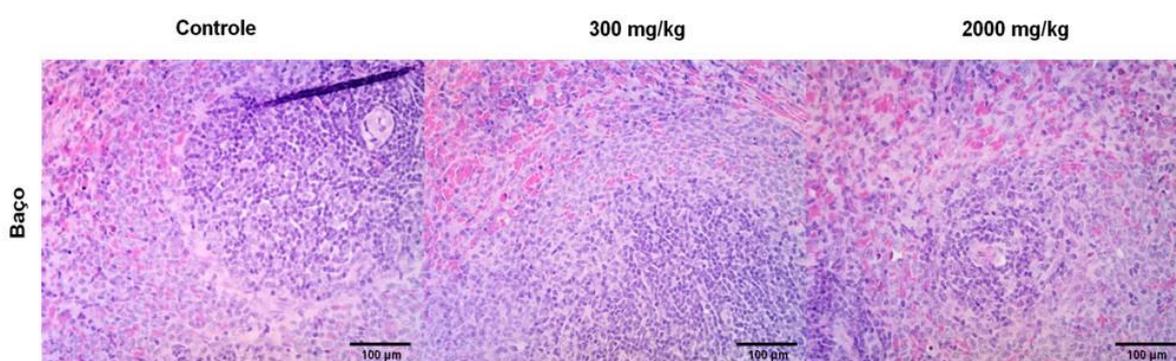


Tabela 9. Escores da análise de histopatológica do baço

Grupo	Folículos bem formados e preservados	Hiperplasia da polpa branca	Congestão da polpa vermelha	Presença de megacariócitos	Hemorragia	Pigmentos de hemossiderina e/ou lipofuscina
Salina 1	+	+	+	-	+	-
Salina 2	+	+	+	-	+	-
Salina 3	+	+	+	-	+	-
Chá 300 mg/kg	+	+	+	-	+	-
Chá 300 mg/kg	+	+	+	-	+	-
Chá 300 mg/kg	+	+	+	-	+	+
Chá 2000 mg/kg	+	+	+	-	+	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	+	-	+	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	+	-	+	-

5.5.3 Fígado

As amostras de fígado foram constituídas por cordões de hepatócitos exibindo congestão portal e da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer e discreta hemorragia sinusoidal. Nenhum animal apresentou tumefação celular de hepatócito, degeneração hidrópica, foco inflamatório, esteatose micro/macrovesicular ou necrose focal de hepatócito (Figura 25/Tabela 10).

Figura 25. Análise histopatológica do fígado. No 14º dia das avaliações, o fígado dos animais foi coletado e processado em bloco histológicos. Segmentos de 5 µm foram seccionado e corados (H & E) para análises microscópicas de: arquitetura do tecido, edema, infiltrado celular, necrose e hemorragia.

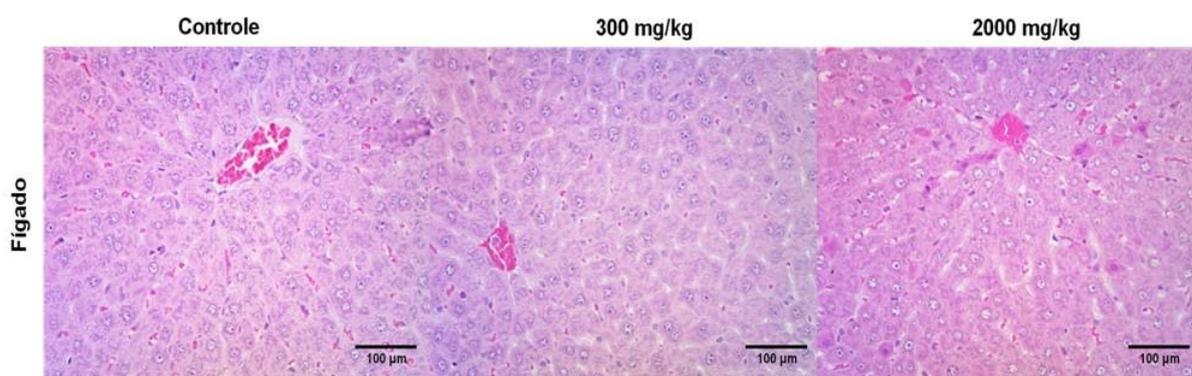


Tabela 10. Escores da análise de histopatológica do fígado

Grupo	Congestão portal e veia centrolobular	Tumefação celular de hepatócito	Degeneração hidrópica	Hiperplasia das céls de Kupffer	Hemorragia sinusoidal	Foco inflamatório	Esteatose microvesicular/macrovesicular	Necrose focal de hepatócito
Salina 1	+	-	-	+	+	-	-	-
Salina 2	+	-	-	+	+	-	-	-
Salina 3	+	-	-	+	+	-	-	-
Chá 300 mg/kg	+	-	-	+	+	-	-	-
Chá 300 mg/kg	+	-	-	+	+	-	-	-
Chá 300 mg/kg	+	-	-	+	+	-	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	-	-	+	+	-	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	-	-	+	+	-	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	-	-	+	+	-	-	-

5.5.4 Rim

As amostras de tecido renal foram compostas por córtex e medula renais com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, com ausência de necrose, glomerulopatias e glomerulonefrites. Um animal do grupo tratado com a dose de 2000 mg/kg apresentou redução do espaço da cápsula de Bowman. Discreta hemorragia sinusoidal pôde ser descrita em todos os grupos (Figura 26/Tabela 11).

Figura 26. Análise histopatológica do rim. No 14º dia das avaliações, o rim dos animais foi coletado e processado em bloco histológicos. Segmentos de 5 µm foram seccionado e corados (H & E) para análises microscópicas de: arquitetura do tecido, edema, infiltrado celular, necrose e hemorragia.

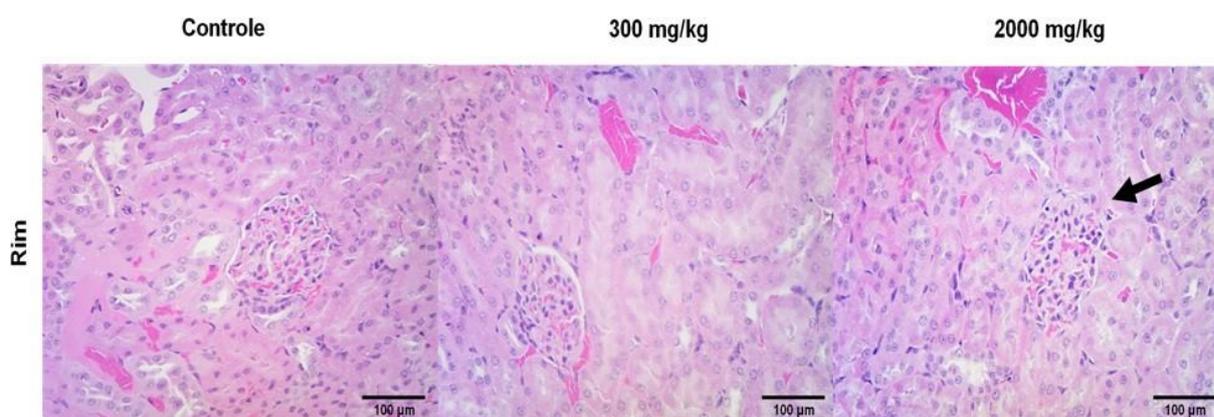


Tabela 11. Escores da análise de histopatológica do rim

Grupo	Preservação da	Tumefação celular do epitélio tubular	Vacuolização do epitélio tubular	Hemorragia	Necrose nefrotóxica	Cilindro- hialino	Células inflamatórias
	estrutura glomerular			tubular e intersticial			
Salina 1	+	-	-	+	-	-	-
Salina 2	+	-	-	+	-	+	-
Salina 3	+	-	-	+	-	-	-
Chá 300 mg/kg	+	-	-	+	-	-	-
Chá 300 mg/kg	+	-	-	+	-	-	-
Chá 300 mg/kg	+	-	-	+	-	-	-
Chá 2000 mg/kg	-	-	-	+	-	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	-	-	+	-	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	-	-	+	-	-	-

5.5.5 Cérebro

As amostras de cérebro apresentaram substância branca e substância cinzenta preservadas, sem alterações em número e dimensões dos corpos celulares neuronais ou dos prolongamentos axonais. Sinais de inflamação, edema, hemorragia ou necrose tecidual foram ausentes em todas as amostras (Figura 27/Tabela 12).

Figura 27. Análise histopatológica do cérebro. No 14º dia das avaliações, o cérebro dos animais foi coletado e processado em bloco histológicos. Segmentos de 5 µm foram seccionado e corados (H & E) para análises microscópicas de: arquitetura do tecido, edema, infiltrado celular, necrose e hemorragia.

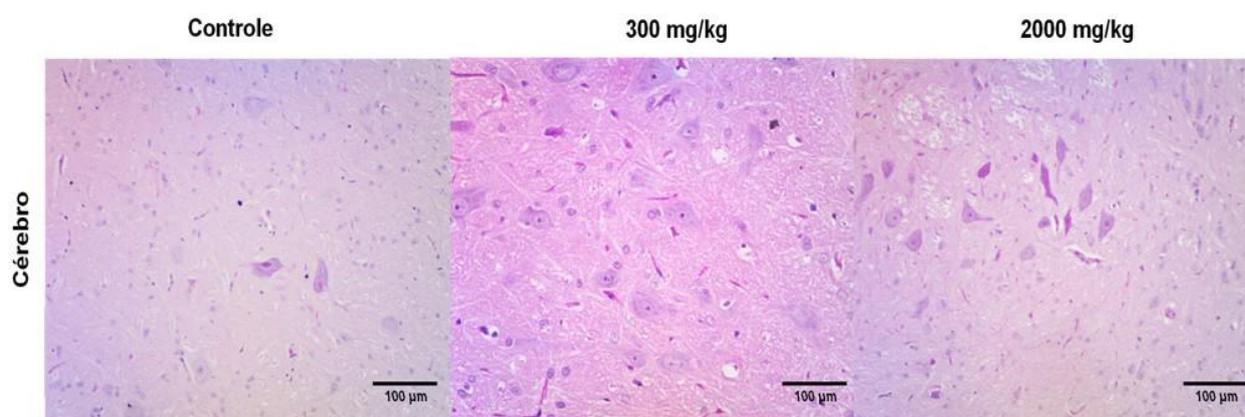


Tabela 12. Escores da análise de histopatológica do cérebro

Grupo	Substância branca	Substância cinzenta		Inflamação	Outros
	preservada	preservada	Corpos celulares		
Salina 1	+	+	+	-	-
Salina 2	+	+	+	-	-
Salina 3	+	+	+	-	-
Chá 300 mg/kg	+	+	+	-	-
Chá 300 mg/kg	+	+	+	-	-
Chá 300 mg/kg	+	+	+	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	+	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	+	-	-
Chá 2000 mg/kg	+	+	+	-	-

6 DISCUSSÃO

Estudos de toxicidade aguda têm como objetivo principal avaliar o uso terapêutico seguro de substâncias, incluindo as naturais como as plantas medicinais, através da identificação de efeitos colaterais e seus níveis de exposição a um determinado organismo (IBRAHIM et al., 2016). Este trabalho avaliou os efeitos decorrentes do tratamento oral, em dose única, com o chá de *Ximenia americana* em ratas, planta vastamente utilizada pela população do sertão central do Nordeste brasileiro para tratamento em diversos processos inflamatórios.

O teste do campo aberto é uma das formas mais utilizadas para a avaliação do comportamento e das funções motoras em modelos animais. Podem-se observar comportamentos excitatórios ou inibitórios das funções vitais dos animais, como, por exemplo, na locomoção, configurando situações de estresse elevado (PRUT; BELZUNG, 2003). Com o objetivo de investigar as alterações de toxicidade a nível cerebral, avaliando as funções comportamentais, sensoriais e motoras após administração do chá de *X. americana*, foram combinados os testes de campo aberto e avaliações do *screening* hipocrático de Malone (MALONE; ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1977).

Nossos resultados não evidenciaram efeitos de sedação ou de analgesia em nenhum dos tempos avaliados após o tratamento com o chá, descartando sinais de toxicidade no sistema nervoso central. Comportamentos exploratórios diminuídos (elevações da cauda e número de cruzamentos) podem ser relacionados a ações sobre o SNC, sugerindo sua inibição e conseqüente efeito sedativo sobre os animais (PRUT; BELZUNG, 2003). De forma contrária, foram observados aumento na atividade somatomotora (lamber patas e movimentação de vibrissas) durante todo o período de avaliação, evento já relatado para outros extratos de planta (SALEEMA et al., 2017)

O ensaio de toxicidade sistêmica é um importante indicador de alterações patológicas e sintomas clínicos em órgãos vitais. Mudanças estruturais e no peso dos órgãos refletem toxicidade por diversos fatores, incluindo alterações no funcionamento de enzimas, lesões e outros distúrbios fisiológicos. Estas avaliações possibilitam o conhecimento do estado geral de saúde dos animais (MICHAEL et al., 2007; SUBRAMANION et al., 2011). Os resultados relativos a este parâmetro mostraram que não houve alteração significativa do peso corpóreo e da massa relativa dos órgãos, sugerindo que o tratamento com o chá de *X. americana* não causa toxicidade sistêmica. Além disso, não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos.

Outro aspecto relevante no acompanhamento das funções fisiológicas é a avaliação hematológica, fornecendo referências principalmente do funcionamento do sistema imunológico e revelando patologias em humanos e animais (BURTIS et al., 2012). Entretanto, o uso de plantas medicinais com potencial tóxico pode alterar esses valores, influenciando na saúde destes organismos (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007). A administração do chá de *X. americana* não provocou alterações nos parâmetros hematológicos gerais (concentração de hemoglobina, hemácias, plaquetas), o que reflete ausência de efeitos adversos no sistema hematopoiético.

Entretanto, os grupos dos animais tratados com o chá nas doses de 300 e 2000 mg/kg tiveram um aumento significativo no número total de leucócitos e linfócitos. Os neutrófilos são as células centrais da imunidade inata, capazes de desenvolver diversas estratégias (fagocitose, produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio) de defesa contrapatógenos (CHATFIELD; THIEBLEMON; WITKO-SARSAT, 2018). Os linfócitos também medeiam a resposta imune, mas principalmente através da produção de anticorpos (PEARCE et al., 2013). O aumento destas células pode sugerir um efeito imunoestimulador sistêmico decorrente do tratamento com a planta, fato que já foi demonstrado em prévios estudos de toxicidade com extratos de plantas (UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2019; SALEEMA et al., 2017; ADEDAPO et al., 2004),

inclusive para extratos polissacarídicos (PEREIRA et al., 2012 b), assemelhando-se ao chá utilizado neste estudo, composto majoritariamente de polissacarídeos (MARQUES et al., 2020).

O uso de substâncias a longo prazo pode resultar em hepatotoxicidade, mensurado pelas alterações dos níveis das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (OZER et al., 2008), além do comprometimento da função renal, proporcionado pelo aumento dos níveis de creatinina sérica e uréia (TRAVLOS et al., 1996). Nossos resultados referentes à análise bioquímica do plasma sanguíneo, após quatorze dias da administração, não revelaram diferenças significativas nas concentrações de glicose, ALT, AST, creatinina e ureia, mostrando que o chá de *X. americana* não alterou as funções hepáticas e renais dos animais.

A avaliação histopatológica dos órgãos é uma ferramenta vastamente utilizada em ensaios de toxicidade porque pode fornecer evidências que comprovam e complementam os resultados obtidos nas análises hematológicas e bioquímicas. Neste estudo, as análises microscópicas dos órgãos examinados não mostraram bruscas alterações morfológicas, sinais de necrose ou focos inflamatórios, quando comparados ao grupo controle, podendo-se sugerir que o chá não causou efeito tóxico. Entretanto, na análise do fígado, os animais

apresentaram sinais de congestão portal, alertando para um possível efeito hepatotóxico. A literatura relata que este efeito pode estar relacionado aos hormônios, visto haver diferenças no desenvolvimento de lesões hepáticas entre ratos machos e fêmeas (MILLER, 2001; DONGMO et al., 2019).

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o chá das cascas do caule de *Ximenia americana* é relativamente seguro quando administrado por via oral em ratos, visto que, nas doses testadas (300 e 2000 mg/kg) não causou letalidade, alterações significativas nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, morfológicos e histopatológicos, e não alterou o peso corporal ou dos órgãos avaliados (cérebro, fígado, estômago, rins e baço). Além disso, este tratamento não alterou parâmetros motores e comportamentais dos animais.

Em suma, este estudo pode contribuir para a padronização segura do uso do chá das cascas de *X. americana* em processos inflamatórios e dolorosos, visto sua vasta utilização popular.

REFERÊNCIAS

- ADCOCK, I. M.; MUMBY, S. Glucocorticoids. **Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD**, p. 171–196, 2016.
- ADEDAPO, A. A.; ABATAN, M. O.; OLORUNSOGO, O. O. Toxic effects of some plants in the genus *euphorbia* on haematological and biochemical parameters of rats. **Veterinarski arhiv**, v. 74, n. 1, p. 53–62, 2004.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SANCHEZ-PATAN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Med. Hypotheses**, v. 68, p. 202–209, 2007.
- AMMAR, I.; BARDAA, S.; MZID, M.; SAHNOUN, Z.; REBAII, T.; ATTIA, H.; ENNOURI, M. Antioxidant, antibacterial and *in vivo* dermal wound healing effects of *Opuntia* flowers extracts. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 81, p. 483–490, 2015.
- ANIĆ, B.; MAYER, M. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Reumatizam.**, v. 61, n. 2, p. 19–23, 2014.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. *Plant Biochemistry*. Bristol: **Academic Press.**, p. 143, 1997.
- ARCHER, C. W.; CATERSON, B.; BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. *The Biology of the Synovial Joint*. **Harwood Academics**, London, 1999.
- BACCHI, S.; PALUMBO, P.; SPONTA, A.; COPPOLINO, M. F. Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.**, v.11, n. 1, p. 52–64, 2012.
- BAGHERI, L.; MADADLOU, A.; YARMAND, M.; MOUSAVI, M. E. Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. **Food Res. Int.**, v. 51, n. 2, p. 866–871, 2013.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed., São Paulo: Atheneu, cap. 1-5, p. 57-68, 2003.
- BeMILLER, J. N. Plant Cell Walls: Economic Significance. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, 5 p., 2001a.
- BeMILLER, J. N. **Polysaccharides**. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, 7 p., 2001b.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal.Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Seção 1, p. 2., Brasília, DF, 23 jun. 2006. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2006/decreto-5813-22-junho-2006-543661-publicacaooriginal-54192-pe.html>. Acesso em: 01 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/05/programa-nacional-plantas-medicinais-fitoter--picos-pnpmf.pdf>. Acesso em: nov. 2020.

BRASILEIRO, M. T.; EGITO, A. A.; LIMA, J. R.; RANDAU, K. P.; PEREIRA, G. C.; NETO, P. J. R. *Ximenia americana* L.: Botânica, Química e Farmacologia no Interesse da tecnologia farmacêutica. **Rev. Bras. de Farmácia**, v. 89, n. 2, p.164-167, 2008.

BRINGEL, P. H. S.; MARQUES, G. F. O.; MARTINS, M. G. Q.; SILVA, M. T. L.; NOBRE, C. A. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; CASTRO, R. R.; ASSREUY, A. M. S. The Lectin Isolated from the Alga *Hypnea cervicornis* Promotes Antinociception in Rats Subjected to Zymosan-Induced Arthritis: Involvement of cGMP Signalization and Cytokine Expression. **Inflammation**, v. 4, p. 1446-1454, 2020.

BROUWERS, H.; VON HEGEDUS, J.; TOES, R.; KLOPPENBURG, M.; IOAN-FACSINAY, A. Lipid mediators of inflammation in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 29, p.741–755, 2015.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, v.17, n.10, p. 2675-2685, 2012.

BURMESTER, G. R.; POPE, J. E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 389, n. 10086, p. 2338–2348, 2017.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. **Phillaephia: Elsevier Health Sciences**; p. 363–368, 2012.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.18, n.1, supl. 1, p.373-382, 2016.

CECCHI, I., DE LA ROSA, I. A., MENEGATTI, E., ROCCATELLO, D., COLLANTES-ESTEVEZ, E., LOPEZ-PEDRERA, C., & BARBARROJA, N. Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 11, p. 1138-1149, 2018.

CHATFIELD, S. M.; THIEBLEMONT, N.; WITKO-SARSAT, V. Expanding neutrophil horizons: new concepts in inflammation. **Journal of Innate Immunity**, v. 10, n. 5-6, p. 422-431, 2018.

CHEN, G.; CHEN, R.; CHEN, D.; YE, H.; HU, B.; ZENG, X.; LIU, Z. Tea

polysaccharides as potential therapeutic options for metabolic diseases. **J. Agr. Food Chem.**, 2018.

CHEN, G.; YUAN, Q.; SAEEDUDDIN, M.; OU, S.; ZENG, X.; YE, H. Recent advances in tea polysaccharides: Extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities. **Carbohydr. Polym.**, v. 153, p. 663–678, 2016.

CHEN, J.; CHEN, X.; QIN, J. Effects of polysaccharides of the *Euphoria longan* (Lour.) Steud on focal cerebral ischemia/reperfusion injury and its underlying mechanism. **Brain Injury**, v. 25, n.3, p. 292–299, jan. 2011.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Quantification of Uronic Acids in Tea Polysaccharide Conjugates and Their Antioxidant Properties. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 52, n. 11, p. 3333–3336, 2004.

CHENG, Q.; WU, H.; DU, Y. The Roles of Small-Molecule Inflammatory Mediators in Rheumatoid Arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2020.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. Nature Reviews. **Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850–861, 2005.

CRONSTEIN, B. N.; AUNE, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, 2020.

CROWSON, C. S., MATTESON, E. L., MYASOEDOVA, E., MICHEC, C. J., ERNSTE, F. C., WARRINGTON, K. J., ... GABRIEL, S. E. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 3, p. 633–639, 2011.

DAVIES, J. M. Extracellular Matrix. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, 11 p., 2001.

DRAGOS, D.; GILCA, M.; GAMAN, L.; VLAD, A.; IOSIF, L.; STOIAN, I.; LUPESCU, O. Phytomedicine in Joint Disorders. **Nutrients**, v. 9, n. 1, 2017.

DECKER, R. S.; KOYAMA, E.; PACIFICI, M. Genesis and morphogenesis of limb synovial joints and articular cartilage. **Matrix Biology**, v. 39, p. 5–10, 2014.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A.; MICHAUD, P. Galactans: An overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian Arch. Biol. Technol.**, v. 54, n. 6, p. 1075–1092, 2011.

Di ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v.104, n. 1, p. 15–29, 1971.

DISCHE, Z. A specific color reaction for glucuronic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 171, n. 2, p. 725–730, 1947.

DONGMO, O. L. M.; EPOH, N. J.; TADJOUA, H. T.; YOUSUF, S.; TELEFO, P. B.;

TAPONDJOU, L. A.; CHOUDHARY, M. I. Acute and sub-acute toxicity of the aqueous extract from the stem bark of *Tetrapleura tetrapleura* Taub. (Fabaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 236, p. 42-49, 2019.

DuBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2014.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, **Immunity**, v. 46, p. 183–196, 2017.

FRY, S. C. Plant Cell Walls. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, p. 1-11, 2001.

EVANGELISTA, S. S.; SAMPAIO, F. C.; PARENTE, R. C. and BANDEIRA, M. F. C. L.. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Rev. Bras. Plantas Mediciniais**, [online], v. 15, n. 4, p. 513-519. 2013

FALCÃO, T. R.; RODRIGUES, C. A. O.; DE ARAÚJO, A. A.; DE MEDEIROS, C. A. C. X.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; ... GUERRA, G. C. B. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, 2019.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 18-29, 2010.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. D. G.; GURGEL JUNIOR, G. D. A implantação da Fitoterapia no SUS: uma avaliação à luz do arcabouço normativo. In: OLIVEIRA, M. H. B. et al. (Orgs.). Direito e saúde: cidadania e ética na construção de sujeitos sanitários. Maceió: **EdUFAL**, 2011.

GIERA, M.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W. M. A. Recent Advancements in the LC- and GC- Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. **Chromatographia**, v. 75, n. 9-10, p. 433–440, 2012.

GOOCH, J. W. Acute Inflammation. **Springer, New York**, p. 872-872, 2011.

GOUT, T.; ÖSTÖR, A. J. K.; NISAR, M. K. Lower gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis patients treated with conventional DMARDs or tocilizumab: a systematic literature review. **Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 11, p. 1471–1474, 2011.

GUAZELLI, C. F. S., STAURENGO-FERRARI, L., ZARPELON, A. C., PINHO- RIBEIRO, F. A., RUIZ-MIYAZAWA, K. W., VICENTINI, F. T. M. C., ... VERRI, W. A. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 175–184, 2018.

HODGSON, E. Introduction to Toxicology. In: HODGSON, E. **A Textbook of Modern**

Toxicology. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, p 3-9, 2004.

HUANG, G.; MEI, X.; HU, J. The Antioxidant Activities of Natural Polysaccharides. **Curr Drug Targets.**, v. 18, n. 11, p. 1296-1300, 2017.

HUONG, N. T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. *In vitro* antioxidant activity of *Vietnamese ginseng* saponin and its components. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 9, p.978-981, 1998.

HUNZIKER, E. B.; QUINN, T. M.; HAUSELMANN, H. J. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, p. 564-572, 2002.

IBRAHIM, M. B.; SOWEMIMO, A. A.; SOFIDIYA, M. O.; BADMOS, K. B.; FAGEYINBO, M. S.; ABDULKAREEM, F. B.; ODUKOYA, O. A. Sub-acute and chronic toxicity profiles of *Markhamia tomentosa* ethanolic leaf extract in rats. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 193, p. 68-75, 2016.

INGEGNOLI, F.; CASTELLI, R.; GUALTIEROTTI, R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. **Disease Markers**,v. 35, p. 727–734, 2013.

JAMES, W. H. Rheumatoid arthritis, the contraceptive pill, and androgens. **Annals of the Rheumatic Diseases.**, v. 52, n. 6, p. 470–474, 1993.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: **Santos Editora**, 1983.

KARNIK, D.; JUNG, J.; HAWKING, S.; WICKER, L. Sugar beet pectin fractionated using isopropanol differs in galacturonic acid, protein, ferulic acid and surface hydrophobicity. **Food Hydrocoll.**, v. 60, p. 179–185, 2016.

KATSIKIS, P.D.; CHU, C.Q.; BRENNAN, F.M.; MAINI, R.N.; FELDMANN, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 179 p. 1517–1527, 1994.

KRISHNADAS, R.; NICOL, R.; SASSARINI, J.; PURI, N.; BURDEN, A. D.; LERNAM, J.; COMBET, E.; PIMLOTT, S.; HADLEY, D.; MCINEES, I. B.; CAVANAGH, J. Circulating tumour necrosis factor is highly correlated with brainstem serotonin transporter availability in humans. **Brain Behav. Immun.**, v. 51, p. 29-38, 2016.

KURAOKA-OLIVEIRA, Â. M., RADAI, J. A. S., LEITÃO, M. M., LIMA CARDOSO, C. A., SILVA-FILHO, S. E., & LEITE KASSUYA, C. A. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity in extract from the leaves of *Eriobotrya japonica*. **J. Ethnopharmacol.**, 112418, 2019.

LAMA, A., SAIKIA,H. Targeted therapies for rheumatoid arthritis:a review. **Int.**

J. Pharm.Sci.Res.,1116–1134. 2011.

LANDUCCI, E. C. T. et al. Inhibition of carrageenan - induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LE, N. H. T.; MALTERUDA, K. E. L.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; NERGÅRDA, C. S.; WANGENSTEEN, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, n. 3, p. 858-862, 2012.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal Models of Nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2002.

LEONG, D. J.; CHOUDHURY, M.; HANSTEIN, R.; HIRSH, D. M.; KIM, S. J.; MAJESKA, R. J.; ... SUN, H. B. Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse posttraumatic osteoarthritis model. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 6, 2014.

LEITE, J. A.; ALVES, A. K. D. A.; GALVÃO, J. G. M.; TEIXEIRA, M. P.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; SCAVONE, C.; ... RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. **Mediat. Inflamm.**, p. 1–12, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4^a. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF-alpha and neuropathic pain: a review. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 27, 2010.

LI, X.; JIANG, J.; SHI, S.; BLIGH, S. W. A.; LI, Y.; JIANG, Y.; ... WANG, S. A RG-II Type Polysaccharide Purified from *Aconitum coreanum* Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Inhibiting the NF-κB Signal Pathway. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, e99697, 2014.

LIN, L.; XIE, J.; LIU, S.; SHEN, M.; TANG, W.; XIE, M. Polysaccharide from *Mesona chinensis*: Extraction optimization, physicochemical characterizations and antioxidant activities. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 99, p. 665–673, 2017.

LIU, J.; WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, C.; LU, S.; LIU, J. The antioxidant and free- radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays L.*) and related flavone glycosides. **Food. Chem.**, v. 126, p. 261–269, 2011.

LIU, Y.; SUN, Y.; HUANG, G. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 111, p. 780–786, 2018.

LUBBERTS, E. The IL-23–IL-17 axis in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 7, p. 415–429, 2015.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natural products - general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 8, n. 2, 127–147, 1983.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: WAGNER H; WOLFF P. New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity. 1. ed. Berlin: **Wolf Springer-Verlag**, p. 23-53, 1977.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 23-53, 1962.

MARGARETTEN, M.; JULIAN, L.; KATZ, P.; YELIN, E. Depression in patients with rheumatoid arthritis: description, causes and mechanisms. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v. 6, n. 6, p. 617-623, 2011.

MARQUES, G. F. O.; CUNHA, A. P.; GABRIEL, F. S. L. M.; RICARDO, N. M. P. S.; PEREIRA, M. P.; ASSREUY, A. M. S. The tea and polysaccharide fractions of *Ximenia americana* stem barks inhibits inflammatory parameters induced by zymosan in mice. **Journal of Biology and Life Science**, v. 11, n. 2, p. 168-180, ago. 2020.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. **Fortaleza: Imprensa Universitária**, p. 122-124, 2007.

MATTOS, G.; CAMARGO, A.; SOUSA, C. A.; ZENI, A. L. B. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735-3744. 2018.

McEVER, R. P. Rolling cell adhesion. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 10, p. 363-396, 2010.

MENGOME, L. E.; VOXEUR, A.; AKUE, J. P.; LEROUGE, P. Screening of antioxidant activities of polysaccharides extracts from endemic plants in Gabon. **Bioact. Carbohydr. Diet Fibre**, v. 3, n. 2, p. 77-88, 2014.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicol. Letters**, v. 140-141, p. 21-30, 2003.

MICHAEL, B.; YANO, B.; SELLERS, R. S.; PERRY, R.; MORTON, D.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; SCHAFFER, K. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: A review of regulatory guidelines and a survey of current practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742-750, 2007.

MICHELON, C.; TIMBONI, D.; ORBEN, A.; MILIOLLI, G.; CERETTA, L.; SIMÕES, P. W. Plant extracts of popular use against oral infections. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v. 29, n. 4, p. 506-514, out./dez., 2016.

MILLER, M. A. Gender-based differences in the toxicity of pharmaceuticals-the food and drug administration's perspective. **Int. J. Toxicol.**, v. 20, p. 149-152, 2001.

MORADI, B., SCHNATZER, P., HAGMANN, S., ROSSHIRT, N., GOTTERBARM, T., KRETZER, J., ... TRETTER, T. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints—analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 2, 2014.

NASEF, N.A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L. R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. **Arch Toxicol.**, v. 91, n. 3, p. 1131–1141, 2017.

NAVARRO-CANO, G.; DEL RINCON, I.; POGOSIAN, S.; ROLDAN, J. F.; ESCALANTE, A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. **Arthritis Rheum.**, v. 48, p. 2425-2433, 2003.

NONOSE, N., PEREIRA, J. A., MACHADO, P. R. M., RODRIGUES, M. R., SATO, D. T., MARTINEZ, C. A. R. Oral administration of curcumin (*Curcuma longa*) can attenuate the neutrophil inflammatory response in zymosan-induced arthritis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 727–734, 2014.

OECD- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: **OECD**, 2001.
OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 239-241, dez. 2003.

OLABISSI, O. A.; MOUSSA, O.; MOUSTAPHA, O.; EDGARD, Z. F.; ELÉONORE, K.; MARIUS, L.; PIERRE, G. I. Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous Ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 5, n. 7, p. 806-811, 2011.

OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic disease? **Arthritis Research & Therapy.**, v. 11, n. 5, p. 252-258, 2009.
OVODOV, I. Polysaccharides of flower plants: structure and physiological activity. **Bioorg. Khim.**, v. 24, n. 7, p. 483-501, 1998.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194–205, 2008.
PASSAGLI, M. Toxicologia Forense – Teoria e Prática. 3. ed. Millennium, p. 01-48, 2012.
PASSOS, M. M. B.; ALBINO, R. C.; FEITOZA-SILVA, M.; OLIVEIRA, D. R. A disseminação cultural das garrafadas no Brasil: um paralelo entre medicina popular e legislação sanitária. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 116, p.248-262, jan./mar. 2018.

PARK, E. H.; KAHNG, J. H.; LEE, S. H.; SHIN, K. H. An anti-inflammatory principle from cactus. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 288-290, 2011.

PEARCE, E. L.; POFFENBERGER, M. C.; CHANG, C. H.; JONES, R. G. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. **Science**, v. 342, n. 6155, p. 1242454–1242454, 2013.

PEDRAZA-ALVA, G.; PÉREZ-MARTÍNEZ, L.; VALDEZ-HERNÁNDEZ, L.; MEZA-SOSA, K. F.; ANDO-KURI, M. Negative regulation of the inflammasome: Keeping inflammation under control. **Immunol. Rev.**, v. 265, p. 231–257, 2015.

PEREIRA, L. P.; MOTA, M. R. L.; BRIZENO, L. A. C.; NOGUEIRA, F. C.; FERREIRA, E. G. M.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. Modulator effect of a polysaccharide- rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α ,

IL-1 β , NO, TGF- β . **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 187, p. 213–22, 2016.

PEREIRA, L.P.; SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H.; DA SILVA, K. E. S.; ASSREUY, A. M.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012a.

PEREIRA, L. P.; SILVA, K. E. S.; SILVA, R. O.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Anti-inflammatory polysaccharides of *Azadirachta indica* seed tegument. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 3, n. 22, p. 617-622, 2012b.

PETRI, B.; BIXEL, M. G. Molecular events during leukocyte diapedesis. **FEBS J.**, v. 273, p. 4399-407, 2006.

PINHEIRO, G. R.C.; KHANDKER, R. K.; SATO, R.; ROSE, A; PIERCY, J. Impact of rheumatoid arthritis on quality of life, work productivity and resource utilisation: an observational, cross-sectional study in Brazil. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 31, p. 334–340, 2013.

PINHO-RIBEIRO; F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor sensory neuron–immune interactions in pain and inflammation. **Trends Immunol.**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.
PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, n. 1-3, p. 03-33, fev. 2003.

RAMAKRISHNAN, R.; PERIYASAMY, R.; LAKKAKULA, S.; SUBRAMANI, P.; AROCKIAM, S. R.; MANIKANDAN, R. *In vitro* propagation and conservation of useful endangered Medicinal Plants with anticancer activity. **J Mol Biol Biotech.**, v.2, n.3, p. 8, 2017

REZANKA, T.; SIGLER, K. Identification of very long chain unsaturated fatty acids from *Ximenia* oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectroscopy. **Phytochem.**, v. 68, p. 925-934, 2007.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; SOUZA, M. H. L. P.; OLIVEIRA, S. H. P.; COSTA, C. H. S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 112, p. 27-35, 1996.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 cause *in vivo* neutrophil migration by a cell dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472- 477, 1991.

RIDGLEY, L. A.; ANDERSON, A. E.; PRATT, A. G. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 30, n. 2, p. 207–214, 2018.

ROSAS, E. C., CORREA, L. B., PÁDUA, T. DE A., COSTA, T. E. M. M., LUIZ MAZZEI, J., HERINGER, A. P., ... HENRIQUES, M. G. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, 490–498, 2015.

ROVEDDER, A. P. M.; PIAZZA, E. M.; THOMAS, P. A.; FELKER, R. M.; HUMMEL, R. B.; FARIAS, J. A. Potential medicinal use of forest species of the Deciduous Seasonal Forest from Atlantic Forest Biome, South Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.

59, p. 1–11, 2016.

ROY, D. K., KUMAR, K. T. M. S., ZOTHANPUIA, KARMAKAR, S., PAL, S., SAMANTA, S. K., ... SEN, T. Pharmacological studies on Indian black tea (leaf variety) in acute and chronic inflammatory conditions. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 6, p. 814– 819, 2008.

SALEEMA, U.; AMINB, S.; AHMADB, B.; AZEEMB, H.; ANWARB, F.; MARYB, S. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. **Toxicology reports**, v. 4, p. 580-585, 2017.

SAMPAIO, L. A.; OLIVEIRA, D. R.; KERNTOPF, M. R.; BRITO-JÚNIOR, F. E.; MENEZES, I. R. A. Percepção dos enfermeiros da estratégia saúde da família sobre o uso da fitoterapia. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 17, n. 1, p. 76-84, jan./mar. 2013.

SCHAIBLE, H. G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 16, p. 5, p. 470, 2014.

SILVA, B. A. F.; DA COSTA, R. H. S.; FERNANDES, C. N.; LEITE, L. H. I.; RIBEIRO-FILHO, J.; GARCIA, T. R.; ... DE MENEZES, I. R. A. HPLC profile and antiedematogenic activity of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) in mice models of skin inflammation. **Food Chem. Toxicol.**, v. 119, p. 199–205, 2018.

SILVA-PANTOJA, P.; ASSREUY, A. M. S.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; MENDONÇA, V. A.; MENDES, T. S.; ... SOARES, P. M. G. The polysaccharide-rich tea of *Ximenia americana* barks prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil inhibition. **J. Ethnopharmacol.**, v. 224, p. 195–201, 2018.

SPILLER, F.; DE OLIVEIRA FORMIGA, R.; FERNANDES DA SILVA COIMBRA, J.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide**, 2019.

STAMP, L. K. ; KHALILOVA, I.; TARR, J. M.; SENTHILMOHAN, R.; TURNER, R.; HAIGH, R. C.; WINYARD, P. G.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, p. 1796–1803, 2012.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 147, p. 59–110, 2014.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SILVA-LEITE, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; MENDONÇA, L. F.; DAMASCENO, L. E. A.; QUEIROZ, M. G. R.; MOURÃO, P. A. S.; ... PEREIRA, M. G. Polysaccharide rich fractions from barks of *Ximenia americana* inhibit peripheral inflammatory nociception in mice. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 27, v. 3, p. 339–345, 2017.

SILVA-LEITE, K. E. S.; GIRÃO, D. K. F. B.; DE FREITAS PIRES, A.; ASSREUY, A. M. S.; DE MORAES, P. A. F.; CUNHA, A. P.; ... SOARES, P. M. G. *Ximenia americana* heteropolysaccharides ameliorate inflammation and visceral hypernociception in murine

caerulein-induced acute pancreatitis: Involvement of CB2 receptors. **Biomed. Pharmacother.**, v. 106, p. 1317–1324, 2018.

SIDDIQUI, N.; RAUF, A.; LATIF, A.; MAHMOOD, Z. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). **J. Taibah Univ. Sci.**, v. 12, n. 4, p. 360–363, 2017.

SIOUTIA, E.; ANDREAKOS, E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. **Biochemical pharmacology**, v. 165, p. 152-159, 2019.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase Isozymes: The biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 3, 387-437, 2004.

SMITH, C. Adhesion molecules and receptors. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, n. 2, p. S375–S379, 2008.

SOLOMON, D. H.; GOODSON, N. J.; KATZ, J. N.; WEINBLATT, M. E.; AVORN, J.; SETOGUCHI, S. Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 65, p. 1608-1612, 2006.

SORO, T. Y.; TRAORE, F.; SAKANDE, J. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). **C. R. Biologies**, v. 332, n. 4, p. 371–377, 2009.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 24, n. 2, p. 121–132, 2010.

SOUZA, R. K. D.; SILVA, M. A. P. DA; MENEZES, I. R. A. DE; RIBEIRO, D. A.; BEZERRA, L. R.; SOUZA, M. M. DE A. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 99–104, 2014.

SOUZA, C. M. P.; BRANDÃO, D. O.; SILVA, M. S. P.; PALMEIRA, A. C.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, A. C. D. Use of medicinal plants with antimicrobial activity by users of the Public Health System in Campina Grande - Paraíba, Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira baseado em AP II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 640, 2005.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, v. 43, suppl., p. S11- S17, 2002.

SUBRAMANION, L. J.; ZAKARIA, Z.; CHEN, Y.; LAU, Y. L.; LATHA, L. Y.; SASIDHARAN, S. Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5268–5282, 2011.

SUN, H. H.; MAO, W. J.; CHEN, Y.; GUO, S. D.; LI, H. Y.; QI, X. H.; ... XU, J. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium sp.* **Carbohydr. Polym.**, v. 78, n. 1, p. 117–124, 2009.

SUNDERKÖTTER, C.; MOSSER, D.; RIDLEY, A.; SORG, C.; ROTH, J. Meeting report: molecular mechanisms of inflammation: how leukocytes come, see and seize. **Eur J Cell Biol.**, v. 82, n. 7, p. 379-383, 2003.

SUO, J.; LINKE, B.; MEYER DOS SANTOS, S.; PIERRE, S.; STEGNER, D., ZHANG, D.; DENIS, D.; ... SCHOLICH, K. Neutrophils mediate edema formation but not mechanical allodynia during zymosan-induced inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 96, n. 1, p. 133–142, 2014.

TEMPRANO, K.; SCARBROUGH, E.; FLOREA, S. C. Rheumatoid arthritis and pregnancy. **Medscape**, 2011 <http://emedicine.medscape.com/article/335186-overview> (acesso em: outubro de 2020).

TESSER, C. D.; SOUSA, I. M. C.; NASCIMENTO, M. C. Práticas integrativas e complementares na Atenção Primária à Saúde brasileira. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 42, número especial, p. 174-188, set. 2018.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B., CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm.**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

TRAVLOS, G. S.; MORRIS, R.W.; ELWELL, M. R.; DUKE, A.; ROSENBLUM, S.; THOMPSON, M. B. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histo-pathology findings in 13-week toxicity studies in rats. **Toxicology**, v. 107, n. 1, p. 17-29, 1996.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**, v. 39, n. 3, p.151-160, jun. 2007.

VEALE, D. J.; ORR, C.; FEARON, U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 4, p. 343–354, 2017.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, maio/jun. 2005.

UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J.; OKOLI, C. O.; UGWAH, M. O.; UMARU, M. L.; OGBULIE, C. S.; MSHELIA, H. E.; UMAR, M.; NJAN, A. A. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* N. E. Brown in mice and rats. **Heliyon**, v. 5, n. 1, e01179, 2019.

WALDRON, K. W.; FAULDS, C. B. Cell wall polysaccharides: composition and structure. **In:** KAMERLING J.; BOONS, G. J.; LEE, Y.; SUZUKI, A.; TANIGUCHI, N.; VORAGEN, A. G. J. (eds) *Comprehensive glycoscience: analysis of glycans/polysaccharide functional properties*, **The Netherlands**, Elsevier, v. 2, p.181-201, 2007.

WALSH, D. A.; MCWILLIAMS, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 581–592, 2014.

WANG, Q.; SHU, Z.; XING, N.; XU, B.; WANG, C.; SUN, G.; SUN, X.; KUANG, H. A pure polysaccharide from *Ephedra sinica* treating on arthritis and inhibiting cytokines expression. **International Journal of Biol Macromol.**, v. 86, p. 177–188, 2016.

WANG, H.; LIU, Y.; QI, Z.; WANG, S.; LIU, S.; LI, X.; ... XIA, X. An Overview on Natural Polysaccharides with Antioxidant Properties. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, n. 23, p. 2899–2913, 2013.

WANG, L.; ZHAO, D.; DI, L.; XU, T.; LIN, X.; YANG, B.; ... LIU, Y. The analgesic and anti-rheumatic effects of *Thladiantha dubia* crude polysaccharide fraction in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, n. 3, p. 1381-1387, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO strategy on traditional medicine 2002-2005. **Geneva: general distribution**, p. 67, 2002. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67163/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf;jsessionid=5251FFEB42CFA8BEE8598F4071870D3A?sequence=1. Acesso em: 31 out. 2020.

WRIGHT, H. L.; BUCKNALL, R. C.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, p. 451–459, 2012.

XIE, J. H.; JIN, M. L.; MORRIS, G. A.; ZHA, X. Q.; CHEN, H. Q.; YI, Y.; ... XIE, M. Y. Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 56, sup. 1, p. S60–S84, 2015.

XU, D. P.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ... LI, H. B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017.

YATOO, M. I.; GOPALAKRISHNAN, A.; SAXENA, A.; PARRAY, O. R.; TUFANI, N.A.; CHAKRABORTY, S.; ... IQBAL, H. M. N. Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders – A Review. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.**, v. 12, 2018.

YU, Y.; SHEN, M.; SONG, Q.; XIE, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydr. Polym.**, v. 183, p. 91–101, 2018.

ZENI, A. L. B.; PARISOTTO, A. V.; MATTOS, G.; HELENA, E. T. S. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, ago. 2017.

ZHANG, A.; LEE, Y. C. Mechanisms for Joint Pain in Rheumatoid Arthritis (RA): from Cytokines to Central Sensitization. **Current Osteoporosis Reports.**, 2018.

ZHAO, Y.; YAN, B., WANG, Z.; LI, M.; ZHAO, W. Natural Polysaccharides with Immunomodulatory Activities. , v. 20, n. 2, p. 96-106, 2020.

ZHAO, T.; MAO, G.; FENG, W.; MAO, R.; GU, X.; LI, T.; ... WU, X. Isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Schisandra sphenanthera*.

Carbohydr. Polym., v. 105, p. 26–33, 2014.

ZHENG, X. L.; WEI, J.; SUN, W.; LI, R.; LIU, S.; DAI, H. Ethnobotanical study on medicinal plants around Limu Mountains of Hainan Island, China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 964–974, 2013.

ZHOU, Z.; TANG, Y.; XIANG, J.; WUA, P.; JIN, H.; WANG, Z.; MORI, M.; CAI, D. Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 131, n. 1, p. 154–164, ago. 2010.

ZHUANG, C., WANG, Y., ZHANG, Y., & XU, N. Oxidative stress in osteoarthritis and antioxidant effect of polysaccharide from *angelica sinensis*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 115, p. 281–286, 2018.

ZHU, J.; CHEN, Z.; CHEN, L.; YU, C.; WEI, X.; WANG, Y. Comparison and structural characterization of polysaccharides from natural and artificial Se-enriched green tea. **Int. J. Biol. Macromol.** , v. 130, p. 388-398, 2019.