

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

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, TOXICOLÓGICOS
E ALERGÊNICOS DO LÁTEX DA PLANTA
CALOTROPIS PROCERA (Ait.) R. Br.**

Valéria Cavalcanti de Aguiar

FORTALEZA

2006

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

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS, TOXICOLÓGICOS
E ALERGÊNICOS DO LÁTEX DA PLANTA
CALOTROPIS PROCERA (Ait.) R. Br.**

Valéria Cavalcanti de Aguiar

**Tese Submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, como Requisito para a Obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.**

FORTALEZA

2006

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

A233a Aguiar, Valéria Cavalcanti de

Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta
Calotropis procera (Ait.) R. Br. / Valéria Cavalcanti de Aguiar

159 f. il., color., enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Orientador: Dr. Márcio Viana Ramos

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

1. Proteínas vegetais 2. Plantas lactíferas 3. Digestibilidade 4. Toxicidade
5. Alergenicidade I. Ramos, Márcio Viana II. Universidade Federal do
Ceará – Doutorado em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

Esta tese foi apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Valéria Cavalcanti de Aguiar

Tese aprovada em: 18/08/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Membro

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de
Alencar
Deptº de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará
Membro

Prof. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Instituto Superior de Ciências Biomédicas
Universidade Estadual do Ceará
Membro

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira
Monteiro Moreira
Centro de Ciências da Saúde
Universidade de Fortaleza
Membro

"Quando nós o fizermos, nós o teremos."

Malcolm Forbes

Dedico este trabalho a meus pais
que dedicaram suas vidas a mim
e a meus irmãos, sobrinhos, amigos e amores
pelas horas roubadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Márcio Viana Ramos, por ter me acolhido em seu laboratório, por ter me iniciado cientificamente na pesquisa em Bioquímica com muita segurança e por toda a paciência, tolerância, ajuda, dedicação e orientação criteriosa que contribuíram para a minha formação.

À Professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, por ter me acolhido em seu laboratório e pela competência na orientação de parte do trabalho experimental, além de toda a ajuda, disponibilidade e incentivo oferecidos.

À Professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos, a quem tenho muita admiração, por toda a ajuda, incentivo e colaboração ofertados ao longo da minha formação.

Às Professoras Dras. Ana Maria Sampaio Assreuy e Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, pelas sugestões e observações dadas na avaliação final deste trabalho.

À Professora Dra. Vânia Maria Maciel Melo, por toda a atenção, interesse, e ajuda na orientação competente dos experimentos de anafilaxia cutânea passiva.

À Ana Alice, estudante de iniciação científica e amiga especial, por toda a ajuda, apoio, trabalho, dedicação e amizade oferecidos principalmente no trabalho experimental.

Ao Jefferson, estudante de iniciação científica e amigo especial, por toda a ajuda, orientação, trabalho, segurança e amizade ofertados principalmente no trabalho experimental.

À Gláís, amiga especial, por todo apoio psicológico e emocional, incentivo, compreensão e amizade oferecidos.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais, Glaís, Ana Alice, Jefferson, Emanuella, Nívea, Lia, Cléverson, Rachel, Diva, Delano, Diego; e do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica, Rodney, Michael, Patrícia, por toda a ajuda e amizade oferecidas.

A todos os colegas que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela cumplicidade, companheirismo e ajuda, em especial a Hévila, Darcy, Betânia e Simone.

Aos meus amigos da “cúpula”, Glaís, Darcy e Hélio Filho, por me fazerem ver que existe vida fora da Bioquímica e por toda a alegria e amizade ofertadas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela atenção dedicada durante todo esse período.

A Deus, à minha família, aos meus amigos, em especial à Regina, por tudo.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Professor Doutor Márcio Viana Ramos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica da Professora Doutora Nylane Maria Nunes de Alencar do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), através da concessão de uma bolsa de estudos outorgada à estudante autora desta tese.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Banco do Nordeste do Brasil (BNB), International Foundation for Science (IFS) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xxi
OBJETIVOS GERAIS	1
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	2
1. Considerações introdutórias iniciais.....	3
2. O látex e as plantas lactíferas.....	4
3. Descrição botânica da planta <i>Calotropis procera</i>	6
4. Uso popular da planta <i>Calotropis procera</i>	7
5. Princípios ativos da planta <i>Calotropis procera</i>	9
6. Potencial farmacológico da planta <i>Calotropis procera</i>	11
7. Outras atividades biológicas relevantes da planta <i>Calotropis procera</i> ...	15
8. Toxicologia da planta <i>Calotropis procera</i>	17
9. Alergia produzida por plantas lactíferas.....	21
10. Considerações introdutórias finais.....	27
11. Referências bibliográficas.....	28
CAPÍTULO II – ASPECTOS BIOQUÍMICOS	41
1. Introdução.....	42
2. Materiais e métodos.....	44
2.1. Materiais.....	44
2.2. Equipamentos.....	44
2.3. Animais.....	45
2.4. Material vegetal.....	46
2.5. Coleta do látex.....	46

2.6. Fracionamento do látex.....	46
2.7. Eletroforese das proteínas do látex.....	47
2.8. Composição de aminoácidos das proteínas do látex.....	48
2.9. Atividade proteolítica <i>in vitro</i> das proteínas do látex.....	49
2.9.1. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex por cromatografia de filtração em gel.....	50
2.9.2. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex por eletroforese.....	51
2.10. Digestibilidade <i>in vivo</i> das proteínas do látex.....	52
2.10.1. Tratamento das fezes.....	53
2.10.2. Eletroforese do material fecal.....	53
2.10.3. Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony.....	54
3. Resultados.....	57
4. Discussão.....	71
5. Referências bibliográficas.....	76
CAPÍTULO III – ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	80
1. Introdução.....	81
2. Materiais e métodos.....	83
2.1. Materiais.....	83
2.2. Equipamentos.....	84
2.3. Animais.....	84
2.4. Preparo da amostra.....	85
2.5. Avaliação da toxicidade subcrônica das proteínas do látex.....	85
2.5.1. Análises bioquímicas séricas.....	87
2.5.2. Contagens total e diferencial de leucócitos sangüíneos e do fluido peritoneal.....	87
2.5.3. Tratamento dos soros.....	88
2.5.4. Eletroforese das proteínas séricas.....	89
2.6. Avaliação da toxicidade aguda das proteínas do látex.....	90
2.7. Análise estatística.....	91
3. Resultados.....	91
4. Discussão.....	106
CAPÍTULO IV – ASPECTOS ALERGÊNICOS.....	122
1. Introdução.....	123

2. Materiais e métodos.....	127
2.1. Materiais.....	127
2.2. Equipamentos.....	127
2.3. Animais.....	128
2.4. Coleta e fracionamento do látex.....	128
2.5. Eletroforese das frações borracha do látex e proteínas do látex....	129
2.6. Imunização por via subcutânea.....	130
2.7. Imunização por via oral.....	131
2.8. Obtenção de anti-soros.....	131
2.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgG e IgA.....	132
2.10. Anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	134
2.10.1. Anafilaxia cutânea passiva para IgG ₁	134
2.10.2. Anafilaxia cutânea passiva para IgE.....	135
2.11. Análise estatística.....	135
3. Resultados.....	136
4. Discussão.....	147
CONCLUSÕES GERAIS.....	158

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
CAPÍTULO II – ASPECTOS BIOQUÍMICOS		
1.	Eletroforese da fração PL.	60
2.	Perfis cromatográficos típicos de filtração em gel de amostras não-digeridas e produtos da digestão da fração PL e BSA monitorados pelo sistema FPLC.	61
3.	Eletroforese das amostras não-digeridas e produtos da digestão da fração PL e BSA por tripsina, quimiotripsina, pepsina e protease de <i>S. griseus</i> .	63
4.	Eletroforese do material fecal dos grupos de ratos não-tratados e tratados com a fração PL durante 35 dias de experimento.	65
5.	Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony para verificação da produção de anticorpos pelo coelho.	66
6.	Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune contra o material fecal dos animais do grupo controle.	67
7.	Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune contra o material fecal dialisado dos animais do grupo controle.	68
8.	Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune contra o material fecal dos animais do grupo experimental.	69
9.	Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune contra o material fecal dialisado dos animais do grupo experimental.	70
CAPÍTULO III – ASPECTOS TOXICOLÓGICOS		
1.	Consumo diário de água ou de PL por grupos de ratos durante 35 dias de experimento.	93
2.	Massas corpóreas de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL, registradas semanalmente durante 35 dias de experimento.	94

3.	Níveis de glicose sangüínea de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL.	95
4.	Eletroforese das proteínas séricas de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL durante 35 dias de experimento.	98
5.	Cavidade abdominal, fígado, rins e baço de ratos não-tratados e tratados com PL.	100
6.	Intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e estômago de ratos não-tratados e tratados com PL.	101
7.	Contagem total e diferencial de leucócitos do fluido peritonial de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL.	102
8.	Contagem total e diferencial de leucócitos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL.	104
9.	Contagem total de leucócitos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL.	105
10.	Neutrófilos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL.	107
11.	Linfócitos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL.	108

CAPÍTULO IV – ASPECTOS ALERGÊNICOS

1.	Eletroforese das frações BL e PL.	137
2.	Cinética da resposta do anticorpo (IgG) sérico específico para o látex de <i>C. procera</i> após a imunização por via subcutânea dos camundongos com PL detectada por ELISA.	139
3.	Resposta do anticorpo (IgG) sérico específico para o látex de <i>C. procera</i> com 0 e 42 dias após a imunização por via subcutânea dos camundongos com PL, PD e BL detectada por ELISA.	141
4.	Resposta do anticorpo (IgA) sérico específico para o látex de <i>C. procera</i> com 0 e 42 dias após a imunização por via subcutânea dos camundongos com PL, PD e BL detectada por ELISA.	142
5.	Resposta do anticorpo IgG ₁ sérico específico para o látex de <i>C. procera</i> após as imunizações pelas vias oral e subcutânea dos camundongos detectada por PCA.	144

- | | | |
|----|---|-----|
| 6. | Resposta do anticorpo IgE sérico específico para o látex de <i>C. procera</i> após as imunizações pelas vias oral e subcutânea dos camundongos detectada por PCA. | 145 |
| 7. | Resposta imune IgE para frações de <i>C. procera</i> . | 146 |

LISTA DE TABELAS

Número	Título	Página
CAPÍTULO II – ASPECTOS BIOQUÍMICOS		
1.	Composição de aminoácidos das proteínas do látex	58
2.	Estimativa percentual da digestibilidade <i>in vitro</i> da fração PL comparada com BSA medida por cromatografia de filtração em gel	62
CAPÍTULO III – ASPECTOS TOXICOLÓGICOS		
1.	Níveis das análises bioquímicas séricas de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL	97
2.	Massas frescas relativas dos órgãos de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL	99

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

1,4 CP	<i>cis</i> -1,4-poliisopreno
A	Absorbância
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BL	Borracha do látex
BSA	Albumina sérica bovina
Da	Dalton
DL ₅₀	Dose letal 50 % (quantidade da substância capaz de causar a morte em 50 % dos animais de uma determinada população)
D _{máx}	Diluição máxima
e.p.m.	Erro padrão médio
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
FPLC	Cromatografia líquida de rápida performance
<i>g</i>	Gravidade
GD	Glutamato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamil transferase
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hev b 1	Fator de alongamento da borracha
Hev b 10	Mn-superóxido dismutase
Hev b 11	Quitinase da classe I
Hev b 12	Proteína de transferência de lipídeo
Hev b 13	Esterase
Hev b 2	β -1,3-glucanase
Hev b 3	Proteína da partícula de borracha pequena
Hev b 4	Microhélix, glicosidase cianogênica
Hev b 5	Proteína ácida ou proteína rica em prolina
Hev b 6.01	Proheveína
Hev b 6.02	Heveína
Hev b 6.03	Terminação C da proheveína
Hev b 7.01	Homóloga da patatina do soro-B, inibidor da biossíntese da borracha
Hev b 7.02	Homóloga da patatina do soro-C
Hev b 8	Profilina
Hev b 9	Enolase ou hidrolase 2-fosfo-D-glicerato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
i.p.	Intraperitonal
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG ₁	Imunoglobulina G ₁
IgM	Imunoglobulina M

IUIS	União Internacional da Sociedade Imunológica
K_2HPO_4	Fosfato de potássio dibásico anidro
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Quilodaltons
KH_2PO_4	Dihidrogenofosfato de potássico
LDH	Lactato desidrogenase
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato monobásico de sódio anidro
NaCl	Cloreto de Sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ND	Não determinado
P	Probabilidade
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio
p.o.	Oral
PBS	Tampão fosfato de potássio
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
PD	Proteínas da diálise
PITC	Fenilisotiocianato
PL	Proteínas do látex
PTC	Feniltiocarbamil
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SD	Sorbitol desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina
Tris	Hidroximetil aminometano
Tween 20	Polioxietilenosorbitano monolaurato
UI	Unidade Internacional

RESUMO

Aspectos Bioquímicos, Toxicológicos e Alergênicos do Látex da Planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

O látex da planta lactífera *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. é um composto biologicamente ativo importante que apresenta propriedades relevantes como as atividades antiinflamatória e antidiarréica, embora já tenha sido previamente mostrado que esse látex produz efeitos tóxicos consideráveis em animais. Um outro fato é que não é sabido, ainda, se as proteínas do látex de *C. procera* produzem efeitos alergênicos, assim como as proteínas do látex de *Hevea brasiliensis*. O potencial do látex como um fármaco, por essa razão, depende da separação das propriedades curativas das propriedades tóxicas e alergênicas, mas não existe investigação científica nessa área. O presente estudo teve como objetivo investigar aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *C. procera*, através do estudo da digestibilidade *in vitro* e *in vivo*, avaliação da toxicidade subcrônica e aguda por via oral e análise da indução de resposta imune pelas vias subcutânea e oral das suas frações. O látex foi fracionado em três frações distintas de acordo com a sua solubilidade em água e tamanho molecular. As frações foram assim denominadas: proteínas do látex (PL), correspondendo às principais proteínas do látex; proteínas da diálise (PD), representando as substâncias de baixa massa molecular; e borracha do látex (BL) que é altamente insolúvel em água. A fração PL foi investigada, com relação a alguns aspectos bioquímicos, como seu perfil protéico por PAGE-SDS e análise da composição de seus aminoácidos. As proteínas do látex também foram submetidas à digestão *in vitro* com as enzimas proteolíticas pepsina, tripsina, quimiotripsina e protease de *Streptomyces griseus* e a digestibilidade *in vitro* foi avaliada por cromatografia de filtração em gel ou PAGE-SDS. A digestibilidade *in vivo* de PL foi analisada quando animais experimentais ingeriram essa fração por 35 dias. O volume de PL consumido foi registrado diariamente e amostras das fezes dos animais coletadas, tratadas e submetidas à PAGE-SDS e ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony, com anticorpos policlonais contra PL. Com relação aos aspectos toxicológicos, a fração PL foi oralmente administrada a animais experimentais por 35 dias, para a avaliação da toxicidade subcrônica. Aumentos na massa corpórea foram registrados e amostras sangüíneas foram analisadas semanalmente. Após o período experimental, os animais foram sacrificados e um número de parâmetros bioquímicos e fisiológicos foram determinados. Esses incluíram determinações séricas de glicose sangüínea, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, testes da função hepática (proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase – ALT e aspartato aminotransferase – AST), testes da função renal (uréia e creatinina), contagens total e diferencial de leucócitos sangüíneos e do fluido peritonal e análise das proteínas séricas por PAGE-SDS. Os animais tiveram seus órgãos vitais (fígado, rins, baço, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e estômago) dissecados e as massas frescas relativas foram determinadas. Na avaliação da toxicidade aguda, a fração PL foi administrada por via oral a animais experimentais e a monitoração de alterações comportamentais desses animais também foi realizada. Quanto aos aspectos

alergênicos, respostas imunológicas do látex de *C. procera* foram investigadas pelas vias oral e subcutânea em camundongos. Anti-soros contra as frações PL, PD e BL foram analisados quanto a IgG e IgA por ELISA, enquanto IgE e IgG₁ foram monitoradas por anafilaxia cutânea passiva (PCA) em ratos e camundongos, respectivamente. Os perfis protéicos das frações PL e BL foram analisados por PAGE-SDS. Com relação aos resultados dos aspectos bioquímicos, a fração PL possui uma quantidade apreciável de proteínas, baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e um número considerável de aminoácidos (arginina, lisina, fenilalanina e tirosina) que representam sítios de clivagem para as enzimas proteolíticas animais usadas. A fração PL foi digerida pela ação da pepsina, tripsina e quimiotripsina como revelado por análises de filtração em gel e PAGE-SDS. A digestão completa das proteínas do látex foi facilmente obtida pelo tratamento com a protease de *S. griseus*. Anticorpos policlonais de coelho produzidos contra PL não apresentaram reação cruzada com as moléculas presentes nas fezes dos ratos experimentais. Padrões semelhantes de eletroforese foram observados para as quantidades desprezíveis de proteína observadas nos materiais fecais dos animais controle e experimentais. Quanto aos resultados da avaliação da toxicidade subcrônica, nenhuma morte foi observada durante o experimento. Animais controle e experimentais apresentaram taxa de crescimento semelhante e os órgãos vitais exibiram massas frescas relativas similares. As funções hepática e renal, parâmetros glicêmicos e lipidêmicos séricos situaram-se em níveis normais. Os padrões protéicos eletroforéticos dos soros dos animais controle e experimental exibiram perfis muito similares. A fração PL não induziu inflamação aguda na cavidade peritoneal dos ratos, como determinado pelas contagens total e diferencial de leucócitos. O resultado mais relevante detectado foi um aparente efeito proliferativo das proteínas do látex sobre os linfócitos sangüíneos que tenderam a aumentar, enquanto os neutrófilos permaneceram em nível normal. Deve ser enfatizado que os animais experimentais exibiram comportamento, aspectos morfológicos e bioquímicos normais, indicando ser improvável que os mesmos estivessem sob qualquer condição patológica ou infecciosa. Portanto, o incremento da população de linfócitos no soro sangüíneo deve ser atribuído a um efeito notável das proteínas do látex e não a qualquer evento prejudicial. A fração PL foi incapaz de induzir toxicidade aguda, pois nenhuma mudança comportamental foi observada nos animais experimentais. Com relação aos resultados dos aspectos alergênicos, nenhuma das frações induziu aumentos nos níveis de anticorpos, quando os camundongos receberam as frações do látex por via oral e, portanto, não desenvolveram alergia. Entretanto, anti-soros de camundongos sensibilizados com PL e BL por administração subcutânea apresentaram resposta imunológica considerável, e PD não induziu síntese de anticorpos. O nível de IgG aumentou consistentemente contra PL e BL, enquanto a resposta de IgA foi detectada unicamente contra PL. PL e BL induziram reações de PCA muito fortes, sugerindo que ambas as frações contêm substâncias do látex envolvidas na alergenicidade. Além disso, a análise protéica de PL e BL sugere que BL ainda retém proteínas residuais, co-precipitadas com a borracha, abundantemente encontradas na fração PL, que poderiam explicar as alergenicidades semelhantes. Nenhuma reação de IgG₁ foi detectada em quaisquer dos anti-soros testados. Conclui-se que as proteínas do látex foram parcialmente susceptíveis à proteólise em ensaios *in vitro* e, ou foram digeridas e

absorvidas, ou foram absorvidas íntegras, quando ingeridas em ensaios *in vivo*. Eventos tóxicos ou letalidade associados ao látex, como descritos na literatura, não estão relacionados com a fração PL. A fração PL produziu efeito proliferativo parcial sobre as células mononucleadas, principalmente linfócitos e não induziu resposta inflamatória aguda, quando administrada pela via oral. Efeitos alergênicos puderam ser detectados, por via subcutânea, com as frações PL e BL, e não foram observados por via oral. Evidências para uma possível tolerância sistêmica às proteínas do látex por via oral foram fornecidas. As proteínas do látex podem atuar como imunoestimulantes. As proteínas do látex permanecem uma fonte interessante de moléculas biologicamente ativas que devem ser estudadas em detalhe quanto às suas propriedades estruturais, funcionais e aplicativas.

Auxílios financeiros: CNPq, PADCT, BNB, FUNCAP e International Foundation for Science (IFS).

ABSTRACT

Biochemical, Toxicological and Allergenic Aspects of the Latex from the Plant *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

The latex of the lactiferous plant *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. is an important biologically active compound that displays relevant properties like antiinflammatory and antidiarrhea activities, although the latex has previously been shown to produce considerable toxic effects on animals. Another question is that it is not known yet whether the latex proteins from *C. procera* induce allergenic effects, just like the latex proteins from *Hevea brasiliensis*. The potential of the latex as a pharmaceutical, therefore, depends on separating the curative properties from the toxic and allergenic properties, but there has been a lack of scientific investigation in this area. The objective of the present study was to investigate biochemical, toxicological and allergenic aspects of the latex from the plant *C. procera*, through the study of *in vitro* and *in vivo* digestibility, evaluation of acute and subchronic toxicity by oral route, and analysis of immune response induction by subcutaneous and oral route of its fractions. The latex was fractionated into three distinct fractions according to their water solubility and molecular size. The fractions were named as: latex proteins (LP), corresponding to the major latex proteins; dialysis proteins (DP), representing low molecular size substances; and rubber latex (RL), which was highly insoluble in water. LP fraction was investigated in some biochemical aspects, like its protein profile by SDS-PAGE analysis and its amino acid composition determination. Latex proteins were also subjected to *in vitro* digestion with trypsin, chemotrypsin, pepsin and *Streptomyces griseus* protease and *in vitro* digestibility was evaluated by gel filtration and SDS-PAGE analysis. The *in vivo* digestibility of LP was analyzed when experimental animals ingested this fraction for 35 days. The volume uptake of LP was recorded daily and samples of fecal material from animals were collected, treated and submitted to SDS-PAGE analysis and radial double immunodiffusion assays, with polyclonal antibodies raised against LP. In relation to toxicological aspects, LP fraction was orally administered to experimental animals for 35 days, to allow subchronic toxicity evaluation. Increases in body mass were recorded and blood samples were analyzed weekly. After the test period, the animals were sacrificed and a number of biochemical and physiological parameters determined. These included sera determinations of blood glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, hepatic function tests (total proteins, albumin, alanine aminotransferase – ALT and aspartate aminotransferase – AST), renal function tests (urea and creatinin), total and differential leukocyte counts in blood and peritoneal fluid and analysis of sera proteins by SDS-PAGE. Animals had internal key organs (liver, kidneys, spleen, small intestine, large intestine, pancreas and stomach) dissected and the relative fresh masses were determined. In the acute toxicity evaluation, LP fraction was administered by oral route to experimental animals and behavioral changes in animals were also monitored. With reference to allergenic aspects, immunological responses of latex from *C. procera* were investigated by oral and subcutaneous routes in mice. Anti-sera against LP, DP and RL fractions were assayed for IgG

and IgA titration by ELISA, while IgE and IgG₁ were accessed by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in rats and mice, respectively. Protein profiles of LP and RL fractions were analyzed by SDS-PAGE. Concerning biochemical aspects results, LP fraction possesses appreciable amount of protein, low content of sulphurated amino acids (methionine and cysteine) and a considerable number of amino acids (arginine, lysine, phenylalanine and tyrosine) that represent cleavage sites to animal proteolytic enzymes studied. LP fraction was digested by the action of pepsin, trypsin and chemotrypsin as revealed by gel filtration and SDS-PAGE analyses. The full LP digestion was easily achieved by *S. griseus* protease treatment. Rabbit polyclonal antibodies raised against LP failed to detect cross-reactive molecules in faeces of experimental rats. Similar patterns of electrophoresis were observed for the negligible amounts of protein observed in the fecal materials of control and test animals. With relation to subchronic toxicity evaluation results, no death was observed during the experiment. Experimental and control animals presented similar growth rate and key organs exhibited similar relative fresh masses. Hepatic and renal functions, sera glycemc and lipidemic parameters were determined to be at normal levels. Likewise, the electrophoretic protein patterns of sera from untreated and treated animals exhibited quite similar profiles. Uptake of latex proteins did not induce acute inflammation into peritoneal cavity of rats as determined by the total and differential leukocytes counts. The most relevant result discovered was an apparent proliferative effect of the latex proteins upon blood lymphocytes that tended to increase, whilst neutrophils remained at normal level. It should be emphasized that the experimental rats were normal in their behavior, morphological and biochemical aspects, indicating that it is unlikely that they were under any pathological or infectious condition. Therefore, the increment of lymphocytes population in the blood serum should be attributed to the staking effect of the latex proteins rather than any harmful event. LP fraction was unable of presenting acute toxicity in experimental animals, because no behavioral changes in animals were observed. Concerning allergenic aspects results, none of the fractions induced antibodies level increases when mice received latex fractions by oral route and thus, did not develop allergy. Nonetheless, anti-sera of mice sensitized with LP and RL by subcutaneous administration displayed considerable immunological response, while DP did not induce antibodies synthesis. IgG level augmented consistently against LP and RL, while IgA response was detected to LP solely. LP and RL induced very strong PCA reactions suggesting that both fractions would contain latex substances involved in allergenicity. Furthermore, protein analysis of LP and RL suggests that RL still retain residual proteins, co-precipitated with rubber, abundantly found in LP, that could explain its similar allergenicity. No IgG₁ reaction was detected in any of the anti-sera tested. It can be concluded that latex proteins were partially susceptible to digestive proteolysis when accessed by *in vitro* assays, and were digested and absorbed, or were absorbed in its intact form, when ingested and analyzed by *in vivo* tests. Toxic events or lethality associated with latex, as described in the literature, are not related to LP fraction. Latex proteins produced partial proliferative effect upon mononuclear cells, mainly lymphocytes and did not induce an acute inflammatory response, when administered by oral route. Allergenic effects could be detected, by subcutaneous route, with LP and RL fractions, and were not observed by oral route. Evidences for an inducible tolerance acquired to latex proteins by oral route were provided. Latex proteins

may act as immune stimulants. The proteins from the latex remain an interesting source of biologically active molecules that should be studied in detail for their structural, functional and applicative properties.

Grants: CNPq, PADCT, BNB, FUNCAP and International Foundation for Science.

OBJETIVOS GERAIS

Investigar aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br., através do estudo da digestibilidade *in vitro* e *in vivo*, avaliação da toxicidade subcrônica e aguda por via oral e análise da indução de resposta imune pelas vias subcutânea e oral das suas frações.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

ÍNDICE	Página
1. Considerações introdutórias iniciais.....	3
2. O látex e as plantas lactíferas.....	4
3. Descrição botânica da planta <i>Calotropis procera</i>	6
4. Uso popular da planta <i>Calotropis procera</i>	7
5. Princípios ativos da planta <i>Calotropis procera</i>	9
6. Potencial farmacológico da planta <i>Calotropis procera</i>	11
7. Outras atividades biológicas relevantes da planta <i>Calotropis procera</i>	15
8. Toxicologia da planta <i>Calotropis procera</i>	17
9. Alergia produzida por plantas lactíferas.....	21
10. Considerações introdutórias finais.....	27
11. Referências bibliográficas.....	28

1. Considerações introdutórias iniciais

A indústria farmacêutica não pára de evoluir. O número de novos produtos que chegam ao mercado mundial é um reflexo convincente dos investimentos em pesquisa de novos componentes e moléculas naturais ou derivadas destas que apresentam atividades biológicas relevantes. Ainda que a busca por tais produtos naturais seja disseminada nos mais diversos grupos de organismos vivos, o reino vegetal ainda é primordialmente a fonte de matéria-prima que mais tem contribuído com a formulação de novos medicamentos.

A extração, caracterização química e estrutural de uma grande diversidade de compostos derivados do metabolismo secundário de plantas têm sido, ao longo do tempo, uma fonte importante para a identificação de moléculas com propriedades farmacêuticas. Por conseguinte, o estudo sistemático de detecção, isolamento e caracterização de novas moléculas é parte fundamental do processo de desenvolvimento de novos fármacos.

A estimativa da indústria farmacêutica, entretanto, é que uma em cada dez mil amostras biológicas, torna-se de fato um produto industrializado. São muitas as limitações encontradas ao longo das pesquisas e são elevados os custos para o desenvolvimento de novas drogas. Um dos caminhos mais curtos seguidos pela indústria é aproveitar o conhecimento popular e o uso empírico de plantas no combate a diferentes enfermidades como ponto de partida para a identificação de moléculas com atividades biologicamente relevantes.

Esta discussão inicial tem por objetivo situar o leitor sobre a pesquisa desenvolvida neste trabalho, que buscou investigar um conjunto de aspectos

biológicos da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. da família Asclepiadaceae. Esta planta, amplamente encontrada no Estado do Ceará, é reconhecidamente uma planta medicinal, cujas propriedades curativas ultrapassam o cunho popular e são reportadas em diversas publicações científicas especializadas.

Suas atividades embora relatadas, não são atribuídas a qualquer molécula até o momento, e ainda que haja descrições relevantes quanto às suas potencialidades, há também relatos de elevada toxicidade em alguns modelos estudados. Neste estudo uma fração rica em proteínas, extraída da parte aérea da planta foi caracterizada em diversos aspectos biológicos com o objetivo de contribuir com a identificação de moléculas envolvidas em atividades importantes assim como buscar determinar suas reais potencialidades e limitações em uso terapêutico.

2. O látex e as plantas lactíferas

O látex é uma secreção vegetal de aspecto leitoso, sendo uma emulsão complexa constituída de proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, alcalóides, carbonatos, resinas e gomas, taninos, terpenos (MORCELLE, CAFFINI e PRIOLO, 2004) e, também de componentes celulares em solução ou em suspensão, dentre eles núcleos, mitocôndrias, ribossomos e ácidos nucléicos (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1986). Essa secreção é um fluido pegajoso, geralmente esbranquiçado, com cor e quantidade variáveis entre as espécies, que é contido internamente sob pressão dentro dos canais lactíferos em quase todos os tecidos da planta. Quando a planta sofre um dano

mecânico, esses canais se rompem e o látex é secretado externamente, ocorrendo um fenômeno de coagulação quando este é exposto ao ar, resultante de reação de oxidação. O processo tipo coagulação envolve a formação de uma rede de polímeros de isopreno que formam uma estrutura denominada de borracha.

Essa secreção está presente em abundância na planta, o que reforça a idéia de que o látex é produzido como uma resposta de defesa contra o ataque de microrganismos tais como vírus e fungos ou mesmo insetos. De fato, é possível notar que em geral as plantas lactíferas são sempre saudáveis e raras são as infecções observadas. Quando injuriada, a planta libera a secreção que tem ação colante e poderia assim imobilizar um inseto ou lagarta (MOURSY, 1997). Entretanto a composição química do látex parece ser também ativa, neste caso agindo quimicamente no combate a fungos e vírus (PEREIRA *et al.*, 1999; HAQUE *et al.*, 2000).

Plantas que produzem látex são denominadas lactíferas. Plantas dos mais diversos habitats, como ervas, arbustos e árvores, são capazes de formar esse exudado citoplasmático de células especializadas, denominadas lactíferos. Formam látex aproximadamente 12.500 espécies que constituem 900 gêneros pertencentes a cerca de 12 famílias, na sua maioria dicotiledôneas (METCALFE, 1967). Algumas famílias de plantas lactíferas são: Euphorbiaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Moraceae, Sapotaceae, Asclepiadaceae, Cichorieae (Asteraceae) e Guttiferae.

3. Descrição botânica da planta *Calotropis procera*

O objeto de estudo da pesquisa sobre proteínas do látex foi a planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br., cujo gênero é pertencente à família Asclepiadaceae, caracterizada por ser rica em plantas com propriedades medicinais. O nome científico da família tem sua origem derivada de Asclépiós – o Deus grego da medicina, enquanto que o nome da espécie vegetal é originário do grego (“kalos” = belo, “tropis” = barco) e do latim (“procerus” = alto, esbelto) (KISSMANN e GROTH, 1999).

A planta constitui-se num arbusto ou subarbórea ereta, perene, com pouca ramificação, e que pode alcançar 3,5 m de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescências fasciculadas terminais. Além disso, seus ramos, folhas, pedúnculos e frutos são recobertos geralmente por serosidade, principalmente nas plantas mais jovens. A sua multiplicação se dá somente através da disseminação das sementes pelo vento (KISSMANN e GROTH, 1999; LORENZI e MATOS, 2002).

C. procera tem sua origem na Índia e África Tropical, mas por ter sido levada como planta ornamental para várias regiões e ter se difundido para ambientes livres em regiões quentes. Essa espécie pode ser encontrada em quase todas as regiões tropicais semi-áridas da América, incluindo o Brasil, onde foi introduzida também como planta ornamental, em Recife, no início do século XIX. No Brasil, a sua distribuição vai do Nordeste, onde é encontrada

com muita freqüência, até o norte de Minas Gerais e, também, ocorre em outras regiões, principalmente em áreas do cerrado (KISSMANN e GROTH, 1999).

Esta planta tem muitos nomes populares, dependendo da região onde é encontrada: algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortêncica (CE), paininha-de-seda (SP), leiteiro (SP, MG), queimadeira e jacaúna (NE).

4. Uso popular da planta *Calotropis procera*

Diferentes partes da planta *C. procera* são utilizadas popularmente no combate aos mais diversos problemas de saúde, sem que haja o conhecimento de quais princípios ativos estão envolvidos nessas atividades farmacológicas. Por exemplo, esse vegetal possui usos como expectorante, anti-helmíntico, laxativo, purgativo, antiinflamatório e diurético (IQBAL *et al.*, 2005). Assim como também é explorado tradicionalmente no tratamento do reumatismo e da malária (SHARMA e SHARMA, 2001).

Pela sua habilidade de contrair a musculatura lisa do trato gastrointestinal, a planta exhibe propriedades espasmogênicas e carminativas (SHARMA, 1934). A mesma tem sido usada tradicionalmente nas doenças do baço, epilepsia e feridas. Esse vegetal também exhibe atividades antifúngica, antimicrobiana e anticancerígena (SHUKLA e MURTI, 1961; MALIK e CHAUGHATII, 1979; HUSSEIN AYOUB e KINGSTON, 1981).

Na medicina tradicional Indiana, essa planta tem sido usada para uma variedade de doenças incluindo lepra, úlceras, tumores, hemorróidas e

doenças do baço, fígado e abdômen. Diferentes partes da planta são utilizadas como eméticas, purgativas e anti-helmínticas (KIRTIKAR e BASU, 1935).

As folhas de *C. procera* são utilizadas para tratar dores de dente, dores nas articulações e enxaqueca (SATYAVATI, RAINA e SHARMA, 1976). Também são usadas no tratamento das febres intermitentes (CHOPRA, ABROL e HANDA, 1960; KAPOOR e KAPOOR, 1980; DUKE, 1985). E há relatos que as mesmas curam dores abdominais (CHOPRA, NAYAR e CHOPRA, 1956).

As flores de *C. procera* são geralmente usadas como anti-helmíntico (IQBAL *et al.*, 2005). Também possuem propriedades digestivas e tônicas (SATYAVATI, RAINA e SHARMA, 1976). Enquanto que os botões das flores misturados com pimenta preta e sal comum são ditos possuidores de atividade antipirética (ANIS e IQBAL, 1986). E quando triturados são usados contra a febre da malária (SINGH e ALI, 1994).

O extrato aquoso das flores de *C. procera* é relatado como possuidor de várias atividades farmacológicas tais como cardiotônica, hepatoprotetiva, antimicrobiana, analgésica, antipirética, antiinflamatória e anticancerígena (MASCOLO *et al.* 1988).

O látex de *C. procera* é usado como veneno de flecha, moluscocida, anti-helmíntico, antidisentérico, anti-reumático, fungicida, anti-sifilítico, antiinflamatório, abortivo, purgativo, emético, diaforético, expectorante, no tratamento da lepra, da asma brônquica e das doenças de pele, e em misturas de preparações Ayurvédicas e na coagulação do leite para a produção de queijo (KIRTIKAR e BASU, 1935; WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962;

AGEEL *et al.*, 1987; AL-YAHYA *et al.*, 1990; JAIN *et al.*, 1996; EL BADWI, 1997; LARHSINI *et al.*, 1997; SHARMA e SHARMA, 2001).

O látex é administrado na febre da malária e na febre leve da tuberculose (KHORY e KATRAK, 1981). Adicionalmente, o exudado de *C. procera* é popularmente explorado para reduzir a infecção fúngica na epiderme e para a dor dental. Além da sua aplicação como um antídoto para o envenenamento por cobra (NANDKARNI, 1976).

As raízes dessa planta têm sido usadas para aliviar a dor sob diferentes condições (SATYAVATI, RAINA e SHARMA, 1976). A casca da raiz é triturada e usada contra a febre da malária (SINGH e ALI, 1994). Por outro lado, o pó da casca da raiz promove alívio nos casos de diarreia (SATYAVATI, RAINA e SHARMA, 1976).

5. Princípios ativos da planta *Calotropis procera*

A planta *C. procera* contém nutrientes como carboidratos (MASCOLO *et al.*, 1988), proteínas e aminoácidos (KOKATE, 1986), além de enzimas proteolíticas (SALUNKE *et al.*, 2005).

Além disso, vários princípios ativos estão presentes nessa espécie vegetal como ácidos orgânicos (KOKATE, 1986), alcalóides, antocianinas (SALUNKE *et al.*, 2005) e carbonatos orgânicos (GALLEGOS OLEA *et al.*, 2002).

O vegetal em estudo é riquíssimo em um grupo de compostos químicos conhecido como cardenolídeos ou glicosídeos cardioativos (SALUNKE *et al.*, 2005).

Exemplos de cardenolídeos ou glicosídeos cardioativos já encontrados em *C. procera* são: calactina, calotoxina (MOSSA *et al.*, 1991), calotropagenina (SEIBER, NELSON e LEE, 1982), calotropaina (BRÜSCHWEILER *et al.*, 1969b), carlotropina (LORENZI, 2000), proceragenina (AKHTAR *et al.*, 1992), procerosida, siriogenina (BRÜSCHWEILER *et al.*, 1969b), uscharidina, uscharina, voruscharina (MOSSA *et al.*, 1991), 2''-oxovoruscharina (VAN QUAQUEBEKE *et al.*, 2005) e uzarigenina (EL-ASKARY *et al.*, 1993).

Outras substâncias químicas também presentes nessa planta são compostos fenólicos (KOKATE, 1986), esteróis (DEEPAK, 1995), triterpenóides (SALUNKE *et al.*, 2005), como: multiflorenol e ciclisadol, além de triterpenóides pentacíclicos, como os chamados acetato de calotropursenil e acetato de calotropfriedelenil, assim como também ésteres norditerpênicos, incluindo o éster norditerpenil, chamado éster calotropterpenil (ANSARI e ALI, 2001).

Além dos princípios ativos já mencionados também são detectados flavonóides, como quercetina, resinas, saponinas e taninos (SALUNKE *et al.*, 2005).

É importante lembrar que também estão presentes outros constituintes como benzoilisoloneolona e benzoiloneolona (CHANDLER, COOMBE e WATSON, 1968), procesterol, uma hidróxi-cetona esteroidal (KHAN e MALIK, 1989), estigmasterol e β -sitosterol (GALLEGOS OLEA *et al.*, 2002), proceraína, uma protease cisteínica estável (KUMAR DUBEY e JAGANNADHAM, 2003),

histamina (SHIVKAR e KUMAR, 2003), frugosida (CHEUNG, NELSON e WATSON, 1988), coroglaucigenina e corotoxigenina, uzarigenona e deglucouzarina (BRÜSCHWEILER, ATÖCKEL e REICHSTEIN, 1969a).

6. Potencial farmacológico da planta *Calotropis procera*

Diferentes partes da planta *C. procera* são relatadas como possuidoras de um número variado de atividades farmacológicas. Dentre estas, o extrato etanólico das partes aéreas da planta *C. procera* mostrou, quando testado em animais de laboratório, atividades antipirética, analgésica e de bloqueio neuromuscular. Nos músculos lisos do íleo do porquinho-da-Índia, o extrato produziu contrações que embasam seu uso na constipação (MOSSA *et al.*, 1991).

Com relação às suas flores, atividade citoestática ou citotóxica contra células cancerígenas de tecidos colo-retais humanos, do extrato etanólico das flores de *C. procera* foi relatada quando a utilização do mesmo resultou na inibição do crescimento dessas células tumorais, usada como um parâmetro da toxicidade (SMIT *et al.*, 1995). Além disso, o extrato etanólico das flores de *C. procera* demonstrou atividade antiinflamatória contra a inflamação induzida por carragenina, além de efeito antipirético e de redução das contorções abdominais induzidas por ácido acético em ratos (MASCOLO *et al.*, 1988).

Atividades também são encontradas nas cascas do tronco de *C. procera*, como a propriedade antitussígena de seu extrato aquoso quando

utilizado no tratamento da irritação brônquica induzida por amoníaco em porquinhos-da-Índia após a administração por via oral (DIEYE *et al.*, 1993).

As raízes da planta *C. procera* são detentoras de várias atividades. A análise do extrato metanólico das cascas das raízes de *C. procera* mostrou atividade antitumor *in vitro* contra células cancerosas humanas (VAN QUAQUEBEKE *et al.*, 2005). Assim como também, atividade contra a úlcera induzida por ácido acetil salicílico, indometacina e etanol foi verificada na fração clorofórmica do extrato de raízes de *C. procera* (SEN, BASU e NAG CHAUDHURI, 1998).

Ainda referindo-se às raízes, uma fração solúvel em clorofórmio das raízes de *C. procera* mostrou atividade antiinflamatória dose-relacionada significativa em ratos, usando-se os modelos farmacológicos do edema de pata induzido pela carragenina, granuloma induzido por pellet de algodão e artrite induzida por formaldeído, além de importante potencial analgésico nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (BASU e NAG CHAUDHURI, 1991).

E finalmente, os extratos etanólico e aquoso das raízes de *C. procera* interrompem o ciclo estral normal em ratos (CIRCOSTA, SANOGO e OCCHIUTO, 2001). O extrato etanólico das raízes de *C. procera* quando administrado oralmente em ratos fêmeas possui uma significativa atividade antiestrogênica/antifertilidade (KAMATH e RANA, 2002).

De todas as partes da planta *C. procera*, seu látex é o mais relatado na literatura como possuidor de atividades farmacológicas importantes. O látex de *C. procera* preparado em propilenoglicol possui um possível potencial

angiogênico e mitogênico por reduzir o tamanho da área agredida quando aplicado em injúrias induzidas na epiderme de porquinhos-da-Índia (RASIK *et al.*, 1999).

Também é importante citar que o látex de *C. procera* inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético em ratos (DEWAN, SANGRAULA e KUMAR, 2000). A atividade antinociceptiva das proteínas do látex de *C. procera* quando administradas intraperitonealmente foi detectada usando-se três modelos experimentais diferentes de nocicepção em camundongos: contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da placa/prato quente (SOARES *et al.*, 2005).

Um efeito farmacológico importante foi que a atividade antidiarréica do látex total de *C. procera* foi identificada no tratamento da diarreia induzida por óleo de mamona em ratos (KUMAR *et al.*, 2001).

Sobre os efeitos antiinflamatórios do látex pode-se citar que a inibição da formação do edema de pata em níveis significantes foi obtida pela administração oral do látex de *C. procera* em ratos antes da indução do edema de pata por carragenina e formalina (KUMAR e BASU, 1994; MAJUMDER e KUMAR, 1997; ARYA e KUMAR, 2005).

Assim como também é válido mencionar que a caracterização do efeito antiinflamatório de uma fração protéica não-dialisável obtida do látex, livre da borracha, administrada intravenosamente, foi realizada usando-se três modelos experimentais diferentes. A resposta inflamatória foi inibida no modelo de edema de pata induzido por carragenina e no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, enquanto que o efeito inibitório não esteve presente no

modelo de edema de pata induzido por dextrano, sugerindo que a atividade antiinflamatória do látex é provavelmente mediada por células (ALENCAR *et al.*, 2004).

O efeito do látex de *C. procera* sobre os músculos lisos do trato gastrointestinal foi estudado. Na administração oral *in vivo*, o resultado foi uma diminuição dose-dependente no trânsito intestinal e no conteúdo intestinal, enquanto que no estudo *in vitro*, em doses baixas, houve a produção dose-dependente de contrações dos músculos lisos gastrointestinais, e em doses altas, desensibilização (KUMAR e SHIVKAR, 2004a).

Efeitos antioxidante e anti-hiperglicêmico do látex seco de *C. procera* foram observados em ratos diabéticos induzidos por aloxano (ROY *et al.*, 2005). O extrato alcoólico do látex de *C. procera* quando administrado oralmente ofereceu proteção ao infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos albinos (MUEEN AHMED, RANA e DIXIT, 2004).

E por último sobre o látex, potente efeito antipirético quando comparado com o efeito máximo do ácido acetil salicílico, usado como droga antitérmica de referência, foi produzido pelo extrato aquoso de *C. procera* (LARHSINI *et al.*, 2002). Além disso, o extrato aquoso de *C. procera* foi avaliado quanto ao seu efeito espasmolítico, demonstrando uma atividade relaxante *in vitro* sobre músculo liso de traquéia de porquinhos-da-Índia (IWALEWA, ELUJOBA e BANKOLE, 2005).

7. Outras atividades biológicas relevantes da planta *Calotropis procera*

Apesar de alguns relatos de toxicidade associados com a administração de *C. procera*, seu uso na medicina está aumentando baseado em evidência empírica no tratamento com sucesso contra vários organismos causadores de diferentes enfermidades. Um desses casos mostra que extratos etanólicos de diferentes partes de *C. procera* (flor, botão de flor, raiz, folha e tronco) inibiram o *Plasmodium falciparum*, mostrando, por conseguinte, a atividade antimalária/antiplasmodial *in vitro* da planta (SHARMA e SHARMA, 1999; SHARMA e SHARMA, 2000).

Deve-se citar inclusive que a possível relação entre a atividade antiplasmodial e o processo de hemólise em eritrócitos normais pode ser analisada visto esses extratos etanólicos terem sido capazes de hemolisar eritrócitos humanos normais *in vitro* (SHARMA e SHARMA, 2001). Além disso, a possível ação larvicida dos extratos aquoso e etanólico do látex e do extrato etanólico das raízes de *C. procera* contra o principal vetor da malária no Marrocos, a larva do mosquito *Anopheles labranchiaae*, foi verificada (MARKOUK *et al.*, 2000).

Sobre a atividade larvicida, vale ressaltar que o látex de *C. procera* quando aplicado topicamente em larvas do terceiro estágio de *Musca domestica* matou e parcialmente digeriu as larvas em 3 h, sendo esse efeito provavelmente de natureza enzimática (MORSY, RAHEM e ALLAM, 2001). Efeitos tóxicos dose- e tempo-dependentes de flavonóides parcialmente purificados obtidos de *C. procera* sobre adultos e ovos de *Callosobruchus*

chinensis (L.) criados em feijões *Vigna radiata* L. foram detectados (SALUNKE *et al.*, 2005).

A atividade inseticida (larvicida, pupicida, adulticida) dos extratos de acetona, etanol, éter de petróleo e água das folhas de *C. procera* contra a mosca varejeira *Sarcophaga haemorrhoidalis* Fallen foi detectada (MOURSRY, 1997).

A atividade anti-helmíntica apresentada pelo látex de *C. procera* também foi encontrada nos extratos metanólico e aquoso de suas flores e no látex contra o nematóide gastrointestinal *Haemonchus (H.) contortus*, sendo detectada através de estudos *in vitro* e *in vivo* em carneiros apresentando a doença hemonchose (AL-QARAWI *et al.*, 2001; IQBAL *et al.*, 2005).

A atividade anticoccidiana do látex de *C. procera* foi identificada na infecção experimental coccidiose de cordeiros com o protozoário *Eimeria ovinoidalis* (MAHMOUD *et al.*, 2001).

Quanto às atividades das folhas de *C. procera*, o seu extrato quando aplicado topicamente no tratamento da dracunculíase promoveu nos pacientes ação analgésica e expulsão acelerada do parasita filária e acentuado processo de cura (FABIYI *et al.*, 1993).

Potencial sobre outros microrganismos foi visto quando a atividade bactericida no extrato n-butanólico das flores de *C. procera* contra bactérias patogênicas foi encontrada (LARHSINI *et al.*, 2001). Assim como, o efeito antibacteriano do extrato n-butanólico de *C. procera* contra bactérias patogênicas também foi verificado (LARHSINI *et al.*, 1999). Além disso, proceragenina, um cardenolídeo isolado de *C. procera* apresenta atividade

antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AKHTAR *et al.*, 1992).

E finalmente, um extrato glicosídeo cardíaco (cardenolídeo) de *C. procera* mostrou atividade acaricida contra os estágios de larva e adulto de *Hyalomma dromedarii* Koch (Acari: Ixodidae) (AL-RAJHY *et al.*, 2003).

8. Toxicologia da planta *Calotropis procera*

Apesar dos muitos relatos científicos sobre atividades farmacológicas e biológicas importantes das diversas partes da planta *C. procera*, e das descrições de seu uso popular no combate às mais variadas enfermidades, também existem registros na literatura sobre a toxicidade apresentada por essa planta.

Entre esses casos encontra-se que os estudos de avaliação da segurança do extrato etanólico das partes aéreas da planta *C. procera* quando testado em porquinhos-da-Índia mostraram que o mesmo quando administrado em doses únicas elevadas (até 3 g/kg) não produziu quaisquer sintomas tóxicos visíveis ou mortalidade. Porém, quando o tratamento era por um período prolongado, ou seja, 90 dias, o extrato causava mortalidade significativamente superior ao do grupo controle (MOSSA *et al.*, 1991).

As folhas frescas de *C. procera* também são tóxicas, pois quando oferecidas para a alimentação de 5 carneiros produziram sinais de toxicidade e morte em 4 deles entre 33 e 83 dias. Perda de apetite, diarreia, dispnéia, alopecia foram os principais sinais clínicos. As lesões consistiram de necrose

hepatocelular e fibrose portal, enterite catarral, hemosiderose esplênica, congestão pulmonar e edema, hemorragia cardíaca e degeneração e/ou necrose das células dos túbulos renais. Essas mudanças foram acompanhadas por um aumento na concentração de amônia, sódio, potássio e creatinina e uma diminuição na concentração de proteínas totais e cálcio sérico. Mudanças hematológicas indicaram o desenvolvimento de uma anemia normocrômica normocítica (MAHMOUD, ADAM e TARTOUR, 1979a).

Ainda com relação às suas folhas, o extrato etanólico das folhas de *C. procera* mostrou citotoxicidade contra células epiteliais amnióticas humanas (AWADH ALI *et al.*, 2001).

No que diz respeito à toxicidade do látex de *C. procera*, estudos foram conduzidos em ratos pretos *Rattus rattus*. O látex foi preparado para administração até a mortalidade ou por um período máximo de 10 dias com farinha de trigo, óleo de amendoim e açúcar nas concentrações de 5, 7,5 ou 10 % (m/m). Os sinais produzidos foram passividade, lentidão, sedação, dispnéia, fraqueza, redução de massa corporal, anorexia, diarreia, hematuria, sangramento nasal, ocular e anal, opacidade ocular, convulsões tetânicas moderadas, colapso e morte, além de alterações histopatológicas. As mortalidades observadas foram de 56,25, 68,75 e 87,5 % com as respectivas doses (PAHWA e CHATTERJEE, 1988).

A toxicidade aguda de *C. procera* foi estudada também em carneiros e cabras que receberam doses únicas ou múltiplas (6 – 0,001 ml/kg) do látex da planta pelas vias oral, intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A administração do látex de *C. procera* por todas as vias causou morte em

ambas as espécies. Os animais desenvolveram sinais nervosos, micção freqüente, taquicardia e dispnéia. Alterações patológicas severas foram vistas no fígado, rins, coração, pulmões, cérebro e intestinos. Essas foram correlacionadas com mudanças nas concentrações séricas de proteínas totais, amônia, bilirrubina, sódio, potássio, cálcio e creatinina (MAHMOUD, ADAM e TARTOUR, 1979b).

Os efeitos tóxicos da administração oral de diferentes doses do látex de *C. procera* sobre as atividades de enzimas metabolizadoras de drogas no fígado, rins e mucosa duodenal de cabras foram investigados. Lesões e alterações na concentração protéica plasmática total e nas atividades da sorbitol desidrogenase (SD), glutamato desidrogenase (GD) e aspartato aminotransferase (AST) plasmáticas foram estudadas. A administração oral diária do látex nas doses de 0,4 e 0,8 ml/kg por 7 dias resultou na inibição significativa da atividade de anilina 4-hidroxilase. Nenhum efeito significativo sobre as atividades de aminopirina N-dimetilase e UDP-glucuroniltransferase foi observado. Uma dose oral única de 1,2 ou 1,6 ml/kg matou cabras dentro de 7 h e resultou nas atividades aumentadas de aminopirina N-dimetilase e anilina 4-hidroxilase. UDP-glucuroniltransferase mostrou-se insensível à injúria tecidual induzida pelo látex de *C. procera* (EL SHEIKH *et al.*, 1991).

Os efeitos relacionados à toxicidade do látex de *C. procera* administrado por diferentes vias sobre cabras foram também investigados. A administração do látex na dose de 1 ml/kg de massa corpórea/dia por via oral ou 0,005 ml/kg de massa corpórea/dia por via intravenosa ou intraperitoneal causou a morte das cabras entre 20 min e 4 dias. Quando uma dose pequena de látex (0,005

ml/kg de massa corpórea/dia) foi administrada por via oral ou intramuscular, nenhuma morte ocorreu entre as cabras. Sinais nervosos, micção freqüente, dispnéia e diarréia foram as principais características nas cabras que receberam látex pelas vias oral, intravenosa ou intraperitoneal. As lesões detectadas foram congestão difundida e hemorragia, cianose pulmonar, enterohepatonefropatia, peritonite (nas cabras que receberam látex pela via intraperitoneal) e miosite hemorrágica no local da injeção do látex. Essas alterações foram acompanhadas por aumentos nas atividades das enzimas séricas glutamato desidrogenase (GDH), lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamil transferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) e nas concentrações de colesterol, uréia e creatinina e diminuições no nível de proteína total (EL BADWI *et al.*, 1998).

Um caso de envenenamento intencional pela planta *C. procera* ocorreu em Curaçao em 1766 com os sintomas da intoxicação pela planta tóxica descritos no “Livro dos Venenos” (RUTTEN e STATIUS VAN EPS, 1998). E um caso de injúria permanente do endotélio celular após a penetração intracorneal do látex de *C. procera* foi relatado em um paciente que desenvolveu edema corneal (AL-MEZAINI *et al.*, 2005).

A relação do látex de *C. procera* com a resposta inflamatória também tem sido relatada na literatura. Esse látex induz em ratos resposta inflamatória dose-dependente e o aumento da permeabilidade vascular no modelo da bolsa de ar (SINGH *et al.*, 2000) resultando em acúmulo de fluido rico em proteínas e leucócitos com envolvimento de prostaglandinas (KUMAR e SHIVKAR, 2004b) e edema de pata (SINGH *et al.*, 2000) associado com hiperalgesia (SEHGAL e

KUMAR, 2005) mediado por histamina (SHIVKAR e KUMAR, 2003) e inibido por interleucina IL-1 β (ARYA e KUMAR, 2004), além de acúmulo de fluido rico em proteínas e infiltração de leucócitos (células polimorfonucleadas e células mononucleadas) na cavidade pleural no modelo de pleurite (SHIVKAR e KUMAR, 2004).

9. Alergia produzida por plantas lactíferas

Cerca de 1.000 espécies de plantas lactíferas produzem a borracha, mas a maioria da borracha natural comercializada é obtida somente a partir da “árvore da borracha”, *Hevea brasiliensis* (VALLON, SAINTE-LAUDY e GUERIN, 1994).

Sob o tronco, mas exteriormente ao floema da árvore lactífera existe uma rede de células especializadas em forma de tubo, chamadas de lactíferos, cujo citoplasma (látex) contém citosol, a borracha (*cis*-1,4-poliisopreno), água e outras organelas e componentes citoplasmáticos. O citoplasma inclui proteínas alergênicas que estão envolvidas na biossíntese do poliisopreno, na coagulação do látex e no sistema de defesa da planta. Além disso, outras enzimas e proteínas estruturais também estão presentes (MOIR, 1959).

Os produtos de borracha são derivados do látex de *H. brasiliensis*, um fluido leitoso obtido por punções no tronco das árvores de *Hevea*. Como todos os materiais vegetais, o látex contém substâncias relacionadas ao crescimento como proteínas, carboidratos e outros constituintes orgânicos e inorgânicos. As partículas de hidrocarboneto da borracha (o componente elástico encontrado

em todos os produtos de borracha) compreendem de 25 % a 45 % do látex. As substâncias não-borracha constituem somente uma pequena porcentagem do látex (MOIR, 1959).

A molécula da borracha é o hidrocarboneto *cis*-1,4-poliisopreno (1,4 CP). Essa molécula também é encontrada em muitas espécies de plantas. Os dados indicam que mais de 1.000 espécies vegetais contêm 1,4 CP. Essa família de isoprenóides compreende mais de 200.000 moléculas diferentes que são encontradas nas membranas celulares e nas estruturas celulares de ambas as plantas e animais. Isoprenóides também atuam como carreadores de elétrons e são importantes na energia celular. Numerosos isoprenos também atuam juntamente às proteínas de defesa que são produzidas pelas plantas contra as pestes e patógenos (TAYLOR, 1986).

A borracha em seu estado natural geralmente não é considerada um alérgeno. Entretanto, na colheita da borracha, as árvores são riscadas para criar injúrias que gotejam a seiva. Em resposta a essa injúria repetida, a árvore produz proteínas de defesa que são incorporadas à seiva que se torna o produto látex. O látex é composto de mais de 250 polipeptídeos, dos quais 60 apresentam tendências de ligação à IgE que podem resultar na reatividade alérgica (POSCH e CHEN-HEIMSOTH, 1977).

A União Internacional da Sociedade Imunológica (IUIS) reconhece 13 proteínas do látex de *H. brasiliensis* como sendo alergênicas, são elas: Hev b 1 (fator de alongamento da borracha); Hev b 2 (β -1,3-glucanase); Hev b 3 (proteína da partícula de borracha pequena); Hev b 4 (microhélix, glicosidase cianogênica); Hev b 5 (proteína ácida ou proteína rica em prolina); Hev b 6.01

(proheveína); Hev b 6.02 (heveína); Hev b 6.03 (terminação C da proheveína); Hev b 7.01 (homóloga da patatina do soro-B, inibidor da biossíntese da borracha); Hev b 7.02 (homóloga da patatina do soro-C); Hev b 8 (profilina); Hev b 9 (enolase ou hidrolase 2-fosfo-D-glicerato); Hev b 10 (Mn-superóxido dismutase); Hev b 11 (quitinase da classe I); Hev b 12 (proteína de transferência de lipídeo) e Hev b 13 (esterase) (IUIS, 2006).

As aplicações comerciais do látex incluem produtos como luvas e preservativos, entre outros. Aproximadamente 40.000 produtos domésticos e médicos contêm látex, tornando difícil, senão impossível, evitar o contato com os alérgenos do látex (GOFFIN, KHARFI e PIERARD-FRANCHIMONT, 2001).

O processamento industrial da borracha compreende uma vasta complexidade de reações químicas. O mesmo requer a combinação, em vários estágios críticos, de um grande número de aditivos químicos. Esses aditivos são usados para dar força, elasticidade, longevidade, cor, textura e uma variedade de outras propriedades à borracha. Tais compostos químicos também incluem fungicidas, absorvedores de luz ultravioleta e agentes bloqueadores, estabilizadores e dúzias de antioxidantes para reduzir a deterioração (EPSTEIN e MAIBACH, 1966).

As luvas de borracha são relativamente fáceis de serem produzidas. Pelo fato da demanda às vezes exceder a produção, alguns fabricantes foram inclinados a cortar etapas no processamento necessárias para a remoção dos alérgenos. Outros, na corrida pelo mercado, usaram processos mais baratos que na realidade aumentaram essas características adversas (TESIOROWSKI, 2003).

A maioria das proteínas do látex é removida quando o látex é processado em seus produtos. Somente uma pequena fração permanece no produto como proteína residual passível de extração que é implicada nas reações alérgicas (DALRYMPLE e AUDLEY, 1992).

Devido à sua solubilidade, a maioria da proteína residual extraível pode ser retirada por lavagem. Portanto, a quantidade dessa fração, embora pequena, varia de produto para produto, dependendo das condições de processamento usadas durante a produção (YIP e CACIOLI, 2002).

Essas proteínas são absorvidas pelo pó das luvas o qual é um carreador de alérgeno. Em algumas luvas, essas proteínas ficam em contato com a pele (LUNDBERG, WRANGSJO e JOHANSSON, 1995).

Devido às excelentes propriedades físicas do elastômero, os produtos de borracha têm sido usados preferencialmente pelo mundo afora há muitos anos. Isso é particularmente verdade para os produtos do látex como luvas e preservativos, os quais são conhecidos por serem uma excelente barreira de proteção contra bactérias e vírus, assim como contra fluidos infecciosos. A recente emergência da alergia às proteínas do látex (hipersensibilidade do tipo I), associada com o uso de luvas e alguns outros produtos do látex, é de grande preocupação para os usuários e fabricantes (YIP e CACIOLI, 2002).

As reações ao látex são reações alérgicas do tipo I (reações do tipo imediato, isto é, podem ser vistas após alguns minutos da exposição) ou reações alérgicas do tipo IV (reações do tipo retardadas, isto é, podem ocorrer horas após a exposição ao alérgeno). As reações observadas podem incluir vertigem, urticária, dermatite de contato, naso-rinite, irritação do trato

respiratório superior, conjuntivite, angioedema local, asma, hipotensão e choque anafilático, o qual pode levar à morte (COLTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

Pelo fato das reações mais severas ao látex serem causadas pela alergia tipo I, os artigos científicos disponíveis na literatura médica sobre a hipersensibilidade do tipo imediato ultrapassam em muito os artigos que tratam com a hipersensibilidade ao látex do tipo IV (GOTTLÖBER, GALL e PETER, 2000).

Reações de hipersensibilidade representam a forma mais comum de resposta imunológica e envolvem as células T e B em uma resposta mediada por imunoglobulinas/anticorpos aos antígenos estranhos. O resultado pode variar de uma inflamação tissular local até uma disfunção orgânica sistêmica. Das 5 imunoglobulinas presentes no corpo, 3 estão envolvidas nas reações de hipersensibilidade. Essas imunoglobulinas são IgG, IgM e IgE. As reações estimuladas por essas imunoglobulinas são classificadas em 4 tipos distintos (tipos I – IV) (COLTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

A reação tipo I é uma hipersensibilidade mediada pela IgE ligada aos mastócitos. A reação com um alérgeno faz com que o mastócito degranule e libere mediadores vasoativos e inflamatórios. A reação ocorre em minutos, e o resultado pode ser visto localmente em tais respostas como rinite alérgica, angioedema, ou dermatite atópica. Indivíduos atópicos têm mais tendência de vivenciar essa reação. Anafilaxia é também uma reação tipo I. A resposta do anticorpo na anafilaxia é uma resposta generalizada do corpo inteiro (ODOM, JAMES e BERGER, 2000).

A alergia do tipo I ao látex pode ser desencadeada pelo contato com o antígeno do látex através das vias cutânea, percutânea, mucosal e parenteral. As manifestações clínicas podem incluir urticária de contato, queimação ou ardência, espirro, coriza, broncoespasmo, asma e anafilaxia. Anafilaxia é a reação potencialmente mais perigosa aos produtos do látex. Na re-exposição ao alérgeno ofensivo, a IgE ligada às proteínas do látex induz diretamente à liberação de histamina e outros mediadores químicos (COHEN, SCHEMAN e STEWART, 1998).

As reações de hipersensibilidade imediata ou do tipo I foram primeiramente relatadas na Alemanha em 1927. Os casos seguintes publicados apareceram 52 anos depois (GOTTLÖBER, GALL e PETER, 2000).

As reações tipo II e tipo III envolvem ambas as imunoglobulinas IgG e IgM. Esses tipos de reações geralmente não estão envolvidos com o látex (COLTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

As reações tipo IV são reações do tipo retardadas mediadas pelos linfócitos T auxiliares. Essas reações são comumente vistas na dermatite de contato alérgica com os sintomas se desenvolvendo latentemente. Os alérgenos do látex podem também estar envolvidos. Os sintomas podem começar a aparecer após 24 h de exposição ou vários dias. Essa reação resulta dos compostos químicos adicionados ao látex durante a colheita, processamento ou produção (COLTRAN, KUMAR e COLLINS, 1999).

A alergia ao látex do tipo IV é uma forma de hipersensibilidade retardada. Os achados clínicos incluem eritema e vesiculação na fase aguda (COHEN, SCHEMAN e STEWART, 1998). Os primeiros relatos sobre a

hipersensibilidade retardada ao látex foram publicados em 1992 e 1993 (GOTTLÖBER, GALL e PETER, 2000).

10. Considerações introdutórias finais

Diante do exposto, o fluido vegetal designado de látex possui as mais diversas propriedades químicas e biológicas. Entretanto, as informações a cerca destes materiais estão quase que sumarizadas ao látex de *H. brasiliensis*. O conhecimento sobre plantas lactíferas e seu látex é consideravelmente incipiente e representa, portanto, uma vasta linha de investigação a ser explorada nos seus mais distintos aspectos. A planta *C. procera* tem se tornado um alvo especial de investigação científica, principalmente quanto aos efeitos produzidos pelo seu látex em sistemas animais. A potencialidade aplicativa de constituintes do látex parece crescer rapidamente. Neste contexto, além de explorar suas atividades relevantes é imperativo estabelecer suas propriedades tóxicas, em particular, buscando obter frações ativas isentas de frações tóxicas. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral analisar aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *C. procera*.

11. Referências bibliográficas

AGEEL, A.M.; MOSSA, J.S.; AL-YAHYA, M.A.; TARIQ, M; AL-SAID, M.S. **Plants used in folk medicine**. Riyadh: King Saud University Press, 1987. [S.p.].

AKHTAR, N.; MALIK, A.; ALI, S.N.; KAZMIT, S.U. Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2821-2824, 1992.

ALENCAR, N.M.; FIGUEIREDO, I.S.; VALE, M.R.; BITENCURT, F.S.; OLIVEIRA, J.S.; RIBEIRO, R.A.; RAMOS, M.V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta Med.**, v. 70, n. 12, p. 1144-1149, 2004.

AL-MEZAINE, H.; AL-RAJHI, A.A.; AL-ASSIRI, A.; WAGONER, M.D. *Calotropis procera* (Ushaar) Keratitis. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 391, n. 1, p. 199-202, 2005.

AL-QARAWI, A.A.; MAHMOUD, O.M.; SOBAIH, M.A.; HAROUN, E.M.; ADAM, S.E.I. A preliminary study on the anthelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 25, n. 1, p. 61-70, 2001.

AL-RAJHY, D.H.; ALAHMED, A.M.; HUSSEIN, H.I.; KHEIR, S.M. Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). **Pest. Manag. Sci.**, v. 59, n. 11, p. 1250-1254, 2003.

AL-YAHYA, M.A.; AL-MESHAL, I.A.; MOSSA, J.S.; AL-BADR, A.A.; TARIQ, M. **Saudi plants: a phytochemical and biological approach**. Riyadh: King Saud University Press, 1990. [S.p.]

ANIS, M.; IQBAL, M. Antipyretic utility of some Indian plants in traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 57, n. 1, p. 52-55, 1986.

ANSARI, S.H.; ALI, M. Norditerpenic ester and pentacyclic triterpenoids from root bark of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. **Pharmazie**, v. 56, n. 2, p. 175-177, 2001.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Interleukin-1 β inhibits paw oedema induced by local administration of latex of *Calotropis procera* extracts. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 391-398, 2004.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 228-232, 2005.

AWADH ALI, N.A.; JÜLICH, W.D.; KUSNICK, C.; LINDEQUIST, U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 173-179, 2001.

BASU, A.; NAG CHAUDHURI, A.K. Preliminary studies on the antiinflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 31, n. 3, p. 319-324, 1991.

BRÜSCHWEILER, F.; ATÖCKEL, K.; REICHSTEIN, T. Calotropis-glykoside, vermutliche teilstruktur. Glykoside und aglykone, 321. **Helv. Chim. Acta**, v. 52, p. 2276-2303, 1969a.

BRÜSCHWEILER, F.; STÖCKLIN, W.; ATÖCKEL, K.; REICHSTEIN, T. Glycosides of *Calotropis procera* R. Br. Glycosides and aglycones 320. **Helv. Chim. Acta**, v. 52, n. 7, p. 2086-2106, 1969b.

CHANDLER, R.F.; COOMBE, R.G.; WATSON, T.R. The digitanols of the root bark of *Calotropis procera* R. Br. **Aust. J. Chem.**, v. 21, p. 1625-1631, 1968.

CHEUNG, H.T.A.; NELSON, C.J.; WATSON, T.R. New glucoside conjugates and other cardenolide glycosides from the monarch butterfly reared on *Asclepias fruticosa* L. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, v.1, p. 1851-1857, 1988.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. **Glossary of Indian medicinal plants**. New-Delhi: C.S.I.R., 1956. p. 46.

CHOPRA, I.C.; ABROL, B.K.; HANDA, K.L. *Calotropis* (Asclepiadaceae). In: _____. **Indigenous drugs of India**. New-Delhi: C.S.I.R., 1960. p. 25.

CIRCOSTA, C.; SANOGO, R.; OCCHIUTO, F. Effects of *Calotropis procera* on oestrous cycle and on oestrogenic functionality in rats. **Farmaco**, v. 56, p. 373–378, 2001.

COHEN, D.E.; SCHEMAN, A.; STEWART, L. American Academy of Dermatology's position paper on latex allergy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 39, p. 98-106, 1998.

COLTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6.ed. London: Saunders, 1999. p. 195-206.

DALRYMPLE, S.J.; AUDLEY, B.G. Allergenic proteins in dipped products: factors influencing extractable protein levels. **Rubber Dev.**, v. 45, p. 51-60, 1992.

DEEPAK, D. The taxonomy and phytochemistry of the Asclepiadaceae in Tropical Asia. In: _____. **Ruthkiew**. Malaysia: Universiti Pertanian, 1995. p. 33.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on the anagelsic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 307-311, 2000.

DIEYE, A.M.; TIDJANI, M.A.; DIOUF, A.; BASSENE, E.; FAYE, B. Senegalese pharmacopoeia: study of acute toxicity and antitussive activity of *Calotropis procera* AIT (Asclepiadaceae). **Dakar Med.**, v. 38, n. 1, p. 69-72, 1993.

DUKE, J.A. *Calotropis procera*. In: _____. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 90-92.

EL SHEIKH, H.A.; ALI, B.H.; HOMEIDA, A.M.; HASSAN, T.; IDRIS, O.F.; HAPKE, H.J. The activities of drug-metabolizing enzymes in goats treated orally with the latex of *Calotropis procera* and the influence of dieldrin pretreatment. **J. Comp. Pathol.**, v. 104, n. 3, p. 257-268, 1991.

EL-ASKARY, H.; HÖLZL, J.; HILAL, S.; EL-KASHOURY, E. Cardenolide glycosides with doubly linked sugars from *Gomphocarpus sinaicus*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1399-1402, 1993.

EL BADWI, S.M.A. **Toxicological studies on latex of medicinal plants: *Calotropis procera*, *Ficus elastica* and *Euphorbia abyssinica***. 1997. [S.p.]. Tese (Doutorado) - Universidade de Khartoum, Khartoum, 1997.

EL BADWI, S.M.A.; ADAM, S.E.; SHIGIDI, M.T.; HAPKE, H.J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 105, n. 11, p. 425-427, 1998.

EPSTEIN, E.; MAIBACH, H.I. Formaldehyde allergy. **Arch. Dermatol.**, v. 94, p. 186, 1966.

FABIYI, J.P.; KELA, S.L.; TAL, K.M.; ISTIFANUS, W.A. Traditional therapy of dracunculiasis in the state of Bauchi – Nigeria. **Dakar Med.**, v. 38, n. 2, p. 193-195, 1993.

GALLEGOS OLEA, R. S.; OLIVEIRA, A. V.; SILVEIRA, L. M.; SILVEIRA, E. R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, p. 263-265, 2002.

GOFFIN, V.; KHARFI, M.; PIERARD-FRANCHIMONT, C. Latex allergy – when uncertainty remains the only certainty. **Rev. Med. Liege**, v. 56, p. 165-169, 2001.

GOTTLÖBER, P.; GALL, H.; PETER, R.U. Allergic contact dermatitis from natural latex. **Am. J. Contact Dermat.**, v. 12, n. 3, p. 135-138, 2000.

HAQUE, M.A.; NAKAKITA, H.; IKENAGA, H.; SOTA, N. Development-inhibiting activity of some tropical plants against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 36, n. 3, p. 281-287, 2000.

HUSSEIN AYOUB, S.M.; KINGSTON, D.G.I. Screening of plants used in Sudan folk medicine for anticancer activity. **Fitoterapia**, v. 2, p. 281-284, 1981.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; JABBAR, A.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.N. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 256-261, n. 2, 2005.

IUIS. INTERNATIONAL UNION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETIES. Allergen Nomenclature. **List of allergens.** Disponível em: <<http://www.allergen.org/List.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

IWALEWA, E.O.; ELUJOBA, A.A.; BANKOLE, O.A. *In vitro* spasmolytic effect of aqueous extract of *Calotropis procera* on Guinea-pig trachea smooth muscle chain. **Fitoterapia**, v. 76, p. 250-253, 2005.

JAIN, S.C.; SHARMA, R.; JAIN, R.; SHARMA, R.A. Antimicrobial activity of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 67, p. 275-277, 1996.

KAMATH, J.V.; RANA, A.C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia**, v. 73, p. 111-115, 2002.

KAPOOR, S.L.; KAPOOR, L.D. Medicinal plant wealth of the Karim nagar district of Andhra Pradesh. **B. Med. Ethnobot. Res.**, v. 1, p. 120-144, 1980.

KHAN, A.Q.; MALIK, A. A steroid from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2859-2861, 1989.

KHORY, R.N.; KATRAK, N.N. *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera*. In: _____. **Materia medica of India and their therapeutics**. Neeraj: [S.I.], 1981. p. 395-396.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. **Indian medicinal plants**. Allahabad: Lolit Mohan Basu, 1935. p. 1606.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: Editora BASF, 1999. 978p. v.2.

KOKATE, C.K. **Practical pharmacognosy**. Delhi: Vallabh Prakashan, 1986. 52p.

KUMAR, V.L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 44, n. 2, p. 123-125, 1994.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 115-118, 2001.

KUMAR DUBEY, V.; JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1057-1071, 2003.

KUMAR, V.L.; SHIVKAR, Y.M. *In vivo* and *in vitro* effect of latex of *Calotropis procera* on gastrointestinal smooth muscles. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 377-379, 2004a.

KUMAR, V.L.; SHIVKAR, Y.M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators Inflamm.**, v. 13, n. 3, p. 151-155, 2004b.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extract of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 68, p. 371-373, 1997.

LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M.; JANA, M. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie**, v. 54, n. 6, p. 763-765, 1999.

LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K.; JANA, M. Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytother. Res.**, v. 3, p. 250-252, 2001.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J.T.; BEKKOUCHE, K.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytother. Res.**, v. 16, p. S97-S98, 2002.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2000. 640p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LUNDBERG, M.; WRANGSJO, K.; JOHANSSON, S.G.O. Latex allergens in glove powdering slurries. **Allergy**, v. 50, p. 378-380, 1995.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2279-2282, 1986.

MAHMOUD, O.M.; ADAM, S.E.I.; TARTOUR, G. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants I. Effects of feeding sheep with the plant. **J. Comp. Pathol.**, v. 89, n. 2, p. 241-250, 1979a.

MAHMOUD, O.M.; ADAM, S.E.I.; TARTOUR, G. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants II. Effects of administration of the latex to sheep and goats. **J. Comp. Pathol.**, v. 89, n. 2, p. 251-263, 1979b.

MAHMOUD, O.M.; HAROUN, E.M.; SOBANH, M.A.; OMER, O.H.; ADAM, S.E.I. Comparative efficacy of *Calotropis procera* latex and sulfadimidine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidalis* infection in Najdi lambs. **Small Rumin. Res.**, v. 42, p. 135-140, 2001.

MAJUMDER, P.K.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory activity of fractions of latex of *Calotropis procera* in carrageenan induced rat paw oedema. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 166-167, 1997.

MALIK, N.N.; CHAUGHATI, M.I.D. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* - a preliminary study. **Pak. J. Sci.**, v. 31, p. 127-130, 1979.

MARKOUK, M.; BEKKOUCHE, K.; LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 293–297, 2000.

MASCOLO, N.; SHARMA, R.; JAIN, S.C.; CAPASSO, F. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, n. 2, p. 211-221, 1988.

METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Econ. Bot.**, v. 21, p. 115-127, 1967.

MOIR, G.F.J. Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. **Nature**, v. 184, p. 1626-1627, 1959.

MORCELLE, S.R.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 480-93, 2004.

MORSY, T.A.; RAHEM, M.A.; ALLAM, K.A. Control of *Musca domestica* third instar larvae by the latex of *Calotropis procera* (Family: Asclepiadaceae). **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 31, n. 1, p. 107-110, 2001.

MOSSA, J.S.; TARIQ, M.; MOHSIN, A.; AGEEL, A.M.; AL-YAHYA, M.A.; AL-SAID, M.S.; RAFATULLAH, S. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. **Am. J. Chin. Med.**, v. 19, n. 3-4, p. 223-231, 1991.

MOURSY, L.E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 27, n.2, p. 505-514, 1997.

MUEEN AHMED, K.K.; RANA, A.C.; DIXIT, V.K. Effect of *Calotropis procera* latex on isoproterenol induced myocardial infarction in albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, p. 327-330, 2004.

NANDKARNI, A.K. **Indian materia medica**. Bombay: Popular Book Depot, 1976. p. 246.

ODOM, W.D.; JAMES, R.B.; BERGER, T.G. **Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology**. 9.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 1135p.

PAHWA, R.; CHATTERJEE, V.C. The toxicity of Indian *Calotropis procera* RBr latex in the black rat, *Rattus rattus* Linn. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 30, n. 4, p. 305-308, 1988.

PEREIRA, L.S.; GOMES, V.M.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Rev. Bras. Bot.**, v. 22, n. 1, p. 27-30, 1999.

POSCH, A.; CHEN-HEIMSOTH, M. Latex allergens: a review of current knowledge. **Pneumologie**, v. 51, p. 1058-1062, 1977.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 261-266, 1999.

ROY, S.; SEHGAL, R.; PADHY, B.M.; KUMAR, V.L. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, n. 3, p. 470-473, 2005.

RUTTEN, A.M.; STATIUS VAN EPS, L.W. Poisoning with toxic plants in Curacao in 1766. **Ned. Tijdschr. Geneeskd.**, v. 142, n. 51, p. 2796-2798, 1998.

SALUNKE, B.K.; KOTKAR, H.M.; MENDKI, P.S.; UPASANI, S.M.; MAHESHWARI, V.L. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. **Crop Protection**, v. 24, p. 888-893, 2005.

SATYAVATI, G.V.; RAINA, M.K.; SHARMA, M. **Medicinal plants of India**. New-Delhi: Indian Council of Medical Research, 1976. v. 1, p. 167-170.

SEHGAL, R.; KUMAR, V.L. *Calotropis procera* Latex-Induced Inflammatory Hyperalgesia-Effect of Antiinflammatory Drugs. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 216-220, 2005.

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

SEN, T.; BASU, A.; NAG CHAUDHURI, A.K. Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* – involvement of 5-lipoxygenase pathway. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 12, p. 82-87, 1998.

SHARMA, G.K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantia*. **Indian J. Vet. Sci.**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. Evaluation of in vitro schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera* – an ethnobotanical approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 83-95, 1999.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 77-79, 2000.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 239-243, 2001.

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

SHIVKAR, Y.M.; KUMAR, V.L. Effect of anti-inflammatory drugs on pleurisy induced by latex of *Calotropis procera* in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 335–340, 2004.

SHUKLA, O.P.; MURTI, C.R.K. Properties and partial purification of bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera*. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 20, p. 109-112, 1961.

SINGH, V.K.; ALI, Z.A. Folk medicines in primary health care: common plants used for the treatment of fevers in India. **Fitoterapia**, v. 65, n. 1, p. 68-74, 1994.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* - a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 43, p. 219-224, 2000.

SMIT, H.F.; WOERDENBAG, H.J.; SINGH, R.H.; MEULENBELD, G.J. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 47, p. 75-84, 1995.

SOARES, P.M.; LIMA, S.R.; MATOS, S.G.; ANDRADE, M.M.; PATROCÍNIO, M.C.A.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V.; CRIDDLE, D.N.; CARDI, B.A.; CARVALHO, K.M.; ASSREUY, A.M.; VASCONCELOS, S.M.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 125-129, 2005.

TAYLOR, J.S. Rubber. In: FISHER, A.A. **Fisher's contact dermatitis**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 1020-1022.

TESIOROWSKI, C.C. Latex allergies in the health care worker. **J. PeriAnesth. Nurs.**, v. 18, n. 1, p. 18-31, 2003.

VALLON, C.; SAINTE-LAUDY, J.; GUERIN, J.C. Asthma by proxy (to latex of a condom). General review based on an observation. **Allerg. Immunol.**, v. 26, p. 248-256, 1994.

VAN QUAQUEBEKE, E.; SIMON, G.; ANDRÉ, A.; DEWELLE, J.; EL YAZIDI, M.; BRUYNEEL, F.; TUTI, J.; NACOULMA, O.; GUISSOU, P.; DECAESTECKER, C.; BRAEKMAN, J.; KISS, R.; DARRO, F. Identification of a novel cardenolide (2''-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent *in vitro* antitumor activities and high *in vivo* tolerance: structure-activity relationship analyses. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 849-856, 2005.

WATT, J.M.; BREYER-BRANDWIJK, M.G. **The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa**. 2.ed. Edinburgh: E&S Livingstone, 1962. p. 127.

YIP, E.; CACIOLI, P. The manufacture of gloves from natural rubber latex. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, n. 2, p. 3-14, 2002.

CAPÍTULO II

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*

ÍNDICE	Página
1. Introdução.....	42
2. Materiais e métodos.....	44
2.1. Materiais.....	44
2.2. Equipamentos.....	44
2.3. Animais.....	45
2.4. Material vegetal.....	46
2.5. Coleta do látex.....	46
2.6. Fracionamento do látex.....	46
2.7. Eletroforese das proteínas do látex.....	47
2.8. Composição de aminoácidos das proteínas do látex.....	48
2.9. Atividade proteolítica <i>in vitro</i> das proteínas do látex.....	49
2.9.1. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex por cromatografia de filtração em gel.....	50
2.9.2. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex por eletroforese.....	51
2.10. Digestibilidade <i>in vivo</i> das proteínas do látex.....	52
2.10.1. Tratamento das fezes.....	53
2.10.2. Eletroforese do material fecal.....	53
2.10.3. Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony.....	54
3. Resultados.....	57
4. Discussão.....	71
5. Referências bibliográficas.....	76

1. Introdução

As plantas medicinais são amplamente usadas pelas populações mais pobres ao redor do mundo. Frequentemente, materiais vegetais crus tais como raízes, cascas de árvores ou folhas são processadas como chás, extratos ou emulsões dependendo da forma como serão posteriormente aplicados.

A planta *C. procera* é uma planta medicinal com várias propriedades curativas relatadas (AL-QARAWI *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2001; CHITME, CHANDRA e KAUSHIK, 2004). De maneira interessante, o látex tem sido descrito como possuidor de propriedades farmacológicas potencialmente exploráveis (RASIK *et al.*, 1999; KAREEM, AKPAN e OSHO, 2003), mas essas propriedades relevantes são acompanhadas por descrições de efeitos tóxicos que se seguem à injeção, administração oral ou contato dérmico com o látex em animais (EL BADWI *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2000; LI e HE, 2003). O potencial do látex como um fármaco, por essa razão, depende da separação das propriedades curativas das propriedades tóxicas, mas não existe investigação científica nessa área.

Plantas lactíferas estão distribuídas em diferentes famílias botânicas e membros da Euphorbiaceae, Asclepiadaceae e Sapotaceae geralmente exibem produção de látex natural. A característica mais proeminente do látex é o alto conteúdo de polímeros formados por unidades de isopreno que originam a sua fração borracha e representam seu principal constituinte químico (MEKKRIENGKRAI *et al.*, 2004). Porém, além da fração poliisopreno, proteínas não-enzimáticas e proteínas enzimáticas, moléculas do metabolismo

secundário como cardenolídeos, carbonatos e aminoácidos estão presentes no látex (KHAN e MALIK, 1989; AKHTAR *et al.*, 1992; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2002).

Atividades farmacológicas, biológicas e toxicológicas relatadas mostradas pelo látex de *C. procera* foram conduzidas usando-se o látex íntegro que foi analisado imediatamente após a coleta. Alternativamente, o material tem sido seco à temperatura ambiente e re-hidratado em soluções desejadas antes do uso (EL SHEIKH *et al.*, 1991; MAHMOUD *et al.*, 2001). Esses procedimentos impedem a identificação de moléculas implicadas em atividades específicas.

O fracionamento do látex em suas frações borracha e livre de borracha antes da análise, diferentemente da execução das estratégias citadas acima proporciona melhor compreensão sobre seus potenciais e suas limitações. A fração livre de borracha do látex de *C. procera* é rica em proteínas solúveis. Esse trabalho descreve um protocolo ao qual o látex total de *C. procera* foi submetido após coleta e a partir de sua fração protéica isenta de borracha e metabólitos de baixa massa molecular, alguns aspectos bioquímicos e susceptibilidade desta à digestão proteolítica foram determinados.

O presente estudo teve como objetivos: fracionar o látex de *C. procera* e proceder à análise bioquímica parcial da sua principal fração protéica extraída, incluindo avaliar o grau de digestibilidade das proteínas do látex através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Trietanolamina, acetonitrila, fenilisotiocianato (PITC), tripsina (E.C. 3.4.21.4), tipo I, extraída de pâncreas bovino, α -quimiotripsina (E.C. 3.4.21.1), tipo II, extraída de pâncreas bovino, pepsina (E.C. 3.4.4.1), extraída da mucosa estomacal de suíno, protease (E.C. 3.4.24.31), tipo XIV bacteriana, extraída da bactéria *Streptomyces griseus*, albumina sérica bovina (BSA) fração V, azul brilhante de Coomassie G-250, acrilamida, N, N' metileno bis-acrilamida, N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina (TEMED), dodecil sulfato de sódio, β -mercaptoetanol, azul brilhante de Coomassie R-350, adjuvante completo de Freund e agarose foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.

Superose 12 HR 10/30, da GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, United Kingdom. Coluna PICO-TAG para aminoácidos (HPLC de fase reversa em coluna C-18) da Waters Corporation, Woburn, Massachusetts, USA. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Equipamentos

Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206, Fanem. Sacos de diálise de membranas de celulose, MC 30x500 CLR Prism. Liofilizador L4KR, EDWARDS Alto Vácuo, BOC do Brasil Ltda. Eppendorf Centrifuge 5415R. HOEFER SE 260 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Unit, GE Healthcare. "Tubos de reação",

Corning Glass Works 6x50 mm. Banho-Maria Y-28, Grant Instruments Cambridge Ltd. Espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare.

2.3. Animais

Os ensaios de digestibilidade *in vivo* foram desenvolvidos usando-se ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, fêmeas, com 2 meses de idade, e 150 – 200 g de massa corpórea. Os animais, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram acondicionados em caixas plásticas e mantidos, no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em salas com temperatura (25 °C) e ciclo claro/escuro (12 h/12 h) controlados, em condições sanitárias apropriadas e com acesso à água e ração *ad libitum*.

Para a produção de anticorpos policlonais, um coelho (*Oryctolagus cuniculus*), New Zealand, fêmea, com 1.800 g de massa corpórea, foi adquirido do criatório de coelhos do Curso de Agronomia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. O animal foi mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará até atingir a idade adulta.

A manutenção e o manuseio dos animais foram realizados de acordo com as regras do Comitê de Ética para a experimentação animal da Universidade Federal do Ceará e essencialmente como determinado pelas

normas internacionais (Organização Mundial da Saúde) (HOWARD-JONES, 1985).

2.4. Material vegetal

O alvo de estudo foi o látex da planta *C. procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae), que é facilmente encontrada em várias áreas de Fortaleza. A espécie em estudo foi identificada com o auxílio do Professor Dr. Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde o exemplar de exsicata N.32663 foi depositado.

2.5. Coleta do látex

O látex fresco produzido naturalmente por plantas não-cultivadas foi coletado, através de incisões no ápice caulinar de espécimes, quando cada extremidade dos ramos da planta alvo foi cortada, em tubos plásticos contendo água destilada (1:2, v/v), que foram levemente agitados, fechados e mantidos à temperatura ambiente até o manuseio no laboratório.

2.6. Fracionamento do látex

O material coletado em água destilada foi submetido à centrifugação a 6.000 x g, por 10 min, a 25 °C. Esta etapa de centrifugação propicia uma precipitação parcial da fração de borracha. A borracha precipitada foi

descartada e o sobrenadante foi exaustivamente dialisado contra água destilada (1:10), por 60 h, a 25 °C, usando-se uma membrana de diálise com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da e, novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, resultando em um sobrenadante rico em proteínas solúveis, límpido e completamente livre de borracha (totalmente precipitada por insolubilidade em água), que foi posteriormente liofilizado e armazenado até utilização nos ensaios *in vitro* ou diluído em água potável (1:2, v/v) e usado imediatamente nos experimentos de digestibilidade *in vivo*. Este material foi denominado de proteínas do látex (PL).

2.7. Eletroforese das proteínas do látex

A fração PL foi examinada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol segundo o método de Laemmli (1970), adaptado para o uso de géis de separação em placas. O processo foi conduzido em gel vertical. Os géis foram montados com dimensões de 8 x 7,5 x 0,1 cm. O gel de aplicação foi preparado de forma a conter 5 % de acrilamida e 10 % de SDS em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação, contendo 12,5 % de acrilamida e 1 % de SDS, foi montado em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8.

Amostras de 10 mg de PL foram dissolvidas em 1 ml de tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 2 % de SDS e 5 % de β -mercaptoetanol) e tratadas por 4 min, a 100 °C. Depois de resfriadas, as amostras foram centrifugadas a 6.000 x g, por 5 min, a 25 °C e aos

sobrenadantes obtidos foram adicionados 3 µl de azul de bromofenol a 0,02 % e 20 mg de sacarose preparando-as, assim, para a corrida eletroforética. Em seguida, amostras de 15 µl foram aplicadas no interior do gel de aplicação, correspondendo a 150 µg de PL em cada poço do gel.

As corridas eletroforéticas foram realizadas sob amperagem constante de 40 mA, voltagem inicial de 100 V e a 25 °C, usando-se como tampão de corrida, Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1 %. Os tempos de corrida variaram entre 2-2,5 h.

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram deixados *overnight* em solução fixadora de proteínas (etanol a 40 %, ácido acético a 10 %, água q.s.p.), corados com azul brilhante de Coomassie R-350 a 0,1 %, preparado em uma solução de água, ácido acético e metanol (8:1:3,5, v/v/v), por um período de 4 h e, em seguida, descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização das bandas protéicas.

2.8. Composição de aminoácidos das proteínas do látex

A análise da composição de aminoácidos foi feita para PL, seguindo a metodologia descrita por Bidlingmeyer, Cohen e Tarvin, (1984). Para a hidrólise de 1 mg de PL, foram utilizados 200 µl de HCl 6 N contendo fenol a 0,1 % (m/v), em “tubos de reação”, sob atmosfera de nitrogênio, por 24 h, a 110 °C.

Em seguida, os frascos foram retirados da estufa e submetidos à secagem completa sob pressão reduzida, para a retirada do excesso de HCl. Depois da adição de 10 µl de uma solução contendo metanol, água e

trietanolamina (2:2:1; v/v/v), os frascos foram agitados vigorosamente e, novamente, os resíduos foram secos sob pressão reduzida.

Logo depois, foi feita a derivatização pré-coluna, que consistiu da adição de 20 µl de uma solução de metanol, água, trietanolamina e fenilisotiocianato (PITC) (7:1:1:1; v/v/v/v), agitação vigorosa, repouso por 20 min, a 25 °C e secagem sob pressão reduzida, para produzir feniltiocarbamil (PTC) aminoácidos.

Os parâmetros de análise foram determinados em coluna PICO-TAG para aminoácidos (HPLC de fase reversa em coluna C-18), a 38 °C, em comprimento de onda de 240 nm. Um gradiente foi obedecido no decorrer do processo: 100 % a 0 % de tampão acetato de sódio, pH entre 5,0 e 7,0 e 0 % a 100 % de acetonitrila.

2.9. Atividade proteolítica *in vitro* das proteínas do látex

Amostras de PL (5 mg/ml) foram submetidas à digestão *in vitro* com as enzimas proteolíticas tripsina, quimiotripsina, pepsina e protease de *Streptomyces griseus* de forma similar a metodologia descrita por Rios *et al.* (1996). As digestões com tripsina e quimiotripsina foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, contendo azida sódica a 0,04 %. Para a pepsina, foi utilizada uma solução de HCl 0,1 M, pH 1,5 a 2. enquanto tampão fosfato de potássio (PBS) 0,1 M, pH 7,5, contendo azida sódica a 0,04 % foi usado para o ensaio com a protease de *S. griseus*. Uma razão proteína/enzima de 100:1 foi

utilizada em todos os casos. As digestões foram realizadas por 3 h, a 37 °C, em banho-maria.

As reações de digestão foram finalizadas pela incubação por 10 min, a 4 °C e centrifugação a 10.000 x g, por 10 min, a 4 °C. Depois, as soluções sobrenadantes foram recuperadas e preparadas para cromatografia de filtração em gel ou eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS).

2.9.1. Avaliação da digestibilidade *in vitro* das proteínas do látex por cromatografia de filtração em gel

Os produtos da digestão da fração PL foram submetidos à cromatografia de filtração em gel em coluna de Superose 12 HR 10/30 acoplada ao sistema FPLC (cromatografia líquida de rápida performance) (RIOS *et al.*, 1996). Foram aplicados 500 µl de cada amostra à coluna previamente equilibrada com as soluções usadas na digestão, exceto para a pepsina que foi digerida em HCl, 0,1 M, pH 1,5 a 2, mas cromatografada em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, contendo azida sódica a 0,04 %. Os produtos da digestão da pepsina foram misturados em um volume igual de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, contendo azida sódica a 0,04 %, antes da aplicação à coluna. Os produtos da digestão da protease foram cromatografados em tampão fosfato de potássio (PBS) 0,1 M, pH 7,5, contendo azida sódica a 0,04 %.

As cromatografias foram traçadas em registrador (Rec-102) calibrado para 1 cm/min, acoplado à unidade ótica do sistema ("Control Unit UV-1" e

“Optical Unit UV-1”), destinada para leituras no espectrofotômetro a 280 nm. Frações de 1 ml/min foram coletadas e suas absorbâncias medidas a 280 nm. Os picos foram registrados e seus tempos de eluição e percentuais de área foram automaticamente integrados.

A verificação da atividade catalítica das enzimas utilizadas (tripsina, quimotripsina, pepsina e protease de *S. griseus*) foi realizada através dos mesmos ensaios enzimáticos descritos acima com uma proteína reconhecidamente de fácil digestão, no caso, a BSA. Os resultados foram analisados baseando-se na comparação do percentual de desaparecimento do principal pico encontrado nas amostras não-digeridas.

2.9.2. Avaliação da digestibilidade *in vitro* das proteínas do látex por eletroforese

Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras foi realizada com os produtos da digestão da fração PL (RIOS *et al.*, 1996). Os experimentos envolvendo eletroforese foram todos efetuados seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), como citado anteriormente (item 2.7) com as seguintes diferenças.

Amostras de 1 ml dos produtos da digestão da fração PL (5 mg/ml) foram misturadas com 1 ml do tampão de amostra para eletroforese 2 vezes concentrado (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contendo 2 % de SDS e 5 % de β -mercaptoetanol) (2,5 mg/ml) e foram preparadas para a corrida eletroforética como descrito antes (item 2.7).

Alíquotas de 16 µl foram aplicadas no interior de cada poço do gel de aplicação, correspondendo a 40 µg de PL. Os produtos da digestão de BSA foram usados como controle para cada enzima. Como controle, BSA e PL incubadas sem enzimas foram avaliadas.

2.10. Digestibilidade *in vivo* das proteínas do látex

Dois grupos de sete ratos Wistar constituíram os grupos controle e experimental e receberam ração comercial *ad libitum* durante um período experimental de 35 dias. O grupo controle teve livre acesso à água potável, enquanto os animais experimentais foram desafiados a beber PL diluídas em água (1:2, v/v) por todo dia e toda noite. O conteúdo protéico dessa amostra foi estimado em 2,5 mg/ml, usando-se o método de Bradford e a BSA como padrão (BRADFORD, 1976). As amostras contendo PL e água recém-preparadas foram renovadas 2 vezes ao dia (7 h/ 19 h) e o volume consumido foi registrado diariamente.

Amostras das fezes de ambos os grupos de animais foram coletadas, sendo após o tratamento, submetidas à análise do seu conteúdo protéico, usando-se o método de Bradford e BSA como padrão (BRADFORD, 1976), PAGE-SDS (LAEMMLI, 1970) e utilizadas nos ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (OUCHTERLONY, 1962) conforme descrito abaixo.

2.10.1. Tratamento das fezes

Amostras das fezes dos animais não-tratados e tratados com PL foram coletadas em intervalos de 3-4 dias correspondendo aos dias 11-14, 15-18, 19-21, 22-25, 26-28, 29-32 e 33-35 do experimento. O material coletado foi desidratado por liofilização, transformado em farinha fina em um triturador e denominado material fecal. Parte desse material liofilizado foi submetido à extração das moléculas solúveis por 1 h em solução salina 0,15 M, seguida de diálise contra água destilada (1:10), por 60 h, a 25 °C, usando-se uma membrana de diálise com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da, e centrifugação a 6.000 x g, por 10 min, a 25 °C. Os sobrenadantes foram liofilizados e denominados material fecal dialisado.

2.10.2. Eletroforese do material fecal

Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras foi realizada com as proteínas do material fecal de cada dia de coleta dos dois grupos de animais. Os experimentos envolvendo eletroforese foram todos efetuados seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), como citado anteriormente (item 2.7) com as seguintes alterações.

Amostras de 10 mg de proteínas do material fecal de cada dia de coleta dos dois grupos de animais foram dissolvidas em 1 ml de tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 2 % de SDS e 5 % de β -mercaptoetanol) e foram preparadas para a corrida eletroforética como descrito antes (item 2.7).

Amostras de 4 µl foram aplicadas no interior de cada poço do gel de aplicação, correspondendo a 40 µg de proteínas do material fecal de cada dia de coleta dos dois grupos de animais.

2.10.3. Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony

Anticorpos policlonais contra PL foram estimulados em um coelho New Zealand, para a realização de ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony, segundo metodologia descrita por Moreira e Cavada (1984). A sensibilização foi induzida por uma dose inicial (dia 0) de 10 mg de PL em solução salina 0,15 M (0,5 ml) e adjuvante completo de Freund (0,5 ml) (10 mg/ml) administrada por via intramuscular na pata traseira do animal. Doses de reforço de 10 mg de PL em 1 ml de solução salina 0,15 M (10 mg/ml) foram posteriormente aplicadas por via subcutânea no dorso do animal sem o adjuvante completo de Freund nos dias 21, 35 e 42.

As amostras sangüíneas do coelho foram coletadas, a partir da veia marginal da orelha, antes da primeira sensibilização (dia 0) e antes das administrações das doses de reforço (dias 35 e 42).

O sangue foi deixado em banho-maria a 37 °C, por 30 min, para retração do coágulo. Posteriormente, o soro foi separado da fase sólida (coágulo) e centrifugado a 6.000 x *g*, por 10 min, a 25 °C, para separação das hemácias. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise contra água destilada (1:10), por 60 h, a 25 °C, usando-se uma membrana de diálise

com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da e liofilização.

Os ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony foram realizados em gel de agarose a 1,5 % em solução salina 0,15 M, contendo 0,02 % de azida sódica, segundo a metodologia de Ouchterlony (1962). Após o preparo e aquecimento do gel a 100 °C, este foi depositado sobre lâminas para microscopia com dimensões de 7,5 x 2,5 x 0,25 cm, totalizando um volume médio de 5,5 ml. Depois que os géis foram resfriados e solidificados nas placas, os mesmos foram perfurados com o auxílio de um perfurador para placas de imunodifusão, produzindo furos esféricos com diâmetro aproximado de 2 mm e capacidade de volumetria média de 10 µl. Os furos foram feitos em posições eqüidistantes e em distribuição radial (poços radiais), havendo um furo no centro (poço central).

Dois tipos de ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony foram realizados. O primeiro ensaio teve como objetivo verificar se houvera a produção de anticorpos policlonais contra PL. O segundo ensaio teve a finalidade de checar, com a utilização dos anticorpos policlonais produzidos no primeiro experimento, se PL que haviam sido ingeridas pelos animais experimentais haviam sofrido proteólise total ou parcial ou permaneciam intactas ao processo digestivo e, portanto, presentes no material fecal e material fecal dialisado dos mesmos.

No primeiro experimento, as soluções de antígenos (proteínas do látex, PL) e anticorpos (anti-soros dos dias 35 e 42 contendo anti-proteínas do látex, anti-PL e soro não-imune do dia zero) foram preparadas em solução salina

0,15 M, contendo 0,02 % de azida sódica. Os anti-soros dos dias 35 e 42 e o soro não-imune do dia zero em estado liofilizado foram preparados para perfazer as concentrações de 17,5 mg/ml e 35 mg/ml. Os antígenos foram preparados a 1 mg/ml e, a partir, desta solução outras diluições foram obtidas (1:2; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80).

No segundo experimento, as soluções de antígenos (material fecal e material fecal dialisado dos grupos de ratos não-tratados e tratados com PL, correspondentes aos dias 11-14, 19-21, 26-28, e 33-35 do experimento) e anticorpos (anti-soro do dia 42 contendo anti-proteínas do látex, anti-PL e soro não-imune do dia zero) foram preparadas usando solução salina 0,15 M contendo 0,02 % de azida sódica. O anti-soro do dia 42 e o soro não-imune do dia zero em estado liofilizado foram preparados para perfazer a concentração de 35 mg/ml. Os antígenos foram preparados nas concentrações de 5, 4, 3 e 2 mg/ml.

As amostras foram depositadas nas placas obedecendo sempre a seguinte distribuição: as soluções dos anticorpos nos poços centrais e as soluções de antígenos em diferentes concentrações nos poços radiais. A dupla difusão de antígenos e anticorpos foi realizada durante 48 h, a 25 °C, em ambiente de câmara umedecida com solução salina 0,15 M, contendo 0,02 % de azida sódica. Ao final do período de difusão, as placas com gel foram imersas em uma solução de 0,1 % (m/v) de corante de azul brilhante de Coomassie R-350 em ácido acético glacial a 7% (v/v) por 1 min, seguido de descoramento em solução contendo 5% (v/v) de metanol, 7% (v/v) de ácido acético glacial e água 88% (v/v). Ao final, as placas foram submetidas

cuidadosamente a um fluxo de calor com o uso de um secador de cabelos, de modo a serem desidratadas e, posteriormente, fotografadas.

3. Resultados

O látex de *C. procera* contém uma quantidade apreciável de proteínas. Embora algumas proteínas possam ser retidas na fração borracha após o procedimento de fracionamento descrito anteriormente (item 2.6), a concentração de proteínas solúveis, determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), no sobrenadante obtido após as etapas de centrifugação foi de 4,5 mg/ml.

A composição de aminoácidos determinada na fração protéica estudada revela baixo conteúdo em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e presença considerável de aminoácidos (arginina, lisina, fenilalanina e tirosina) que representam sítios de clivagem para as enzimas proteolíticas animais (tripsina, quimiotripsina e pepsina) que foram usadas nos ensaios de digestibilidade *in vitro* (TABELA 1).

No estabelecimento do protocolo de separação de PL da sua composição complementar, uma série de eletroforeses exploratórias foi realizada com o objetivo de determinar se de fato, a amostra denominada aqui de PL seria representativa do látex. A extração de proteínas que permanecem ligadas à fração borracha com diferentes soluções e condições tais como, pH e força iônica, sugere que essas proteínas são semelhantes àquelas que

TABELA 1 - Composição de aminoácidos das proteínas do látex

	nMol totais	Mol %	Massa total (µg)
Aminoácidos essenciais			
Fenilalanina (Phe) (F)	1,84	3,35	0,27
Histidina (His) (H)	0,98	1,78	0,13
Isoleucina (Ile) (I)	3,62	6,60	0,41
Leucina (Leu) (L)	2,32	4,23	0,26
Lisina (Lys) (K)	4,48	8,17	0,57
Metionina (Met) (M)	0,57	1,05	0,08
Treonina (Thr) (T)	1,74	3,18	0,27
Triptofano (Trp) (W)	ND	-	-
Valina (Val) (V)	3,83	6,98	0,38
Aminoácidos não-essenciais			
Alanina (Ala) (A)	2,41	4,39	0,17
Arginina (Arg) (R)	2,67	4,88	0,27
Asparagina/Aspártico (Asx) (N,D)	7,25	13,23	0,83
Cisteína (Cys) (C)	0,30	0,54	0,07
Glicina (Gly) (G)	7,68	14,02	0,44
Glutamina/Glutâmico (Glx) (Q,E)	2,22	11,35	0,80
Prolina (Pro) (P)	3,05	5,57	0,30
Serina (Ser) (S)	4,49	8,18	0,39
Tirosina (Tyr) (Y)	1,37	2,50	0,22
Total	54,81	100	5,87

ND – Não determinado

Enzimas proteolíticas: tripsina, quimiotripsina, pepsina e protease de *Streptomyces griseus*

constituem a fração PL, quando analisadas por PAGE-SDS em uma dimensão (FIGURA 1 – CAPÍTULO IV). Desta forma foi assumido que essas proteínas solúveis, chamadas de PL, de fato representam a fração majoritária de proteínas solúveis do látex. O seu perfil protéico eletroforético está apresentado na FIGURA 1.

No que se refere à susceptibilidade à digestão proteolítica, a fração PL foi parcialmente digerida por distintas proteases de acordo com as análises comparativas dos perfis de cromatografia de filtração em gel, obtidos das amostras incubadas com cada enzima ou apenas com as soluções de digestão (FIGURA 2).

Entre as enzimas digestivas animais, a pepsina foi a mais ativa enquanto a tripsina e a quimiotripsina (dados não mostrados) exibiram performances semelhantes e inferiores. As discrepâncias não foram devido às diferentes atividades enzimáticas, pois todas as enzimas eficientemente digeriram a BSA sob condições semelhantes.

As taxas de digestão foram calculadas a partir dos dados coletados do sistema FPLC (TABELA 2), e o desaparecimento do principal pico protéico das amostras não-digeridas com relação às amostras digeridas foi observado pela comparação dos cromatogramas (FIGURA 2) ou pela análise dos produtos da digestão após a eletroforese (FIGURA 3).

A digestão da fração PL e da amostra controle (BSA) pelas proteases foi quase completa sob as mesmas condições experimentais e sugere que os experimentos foram diretamente comparáveis (TABELA 2).

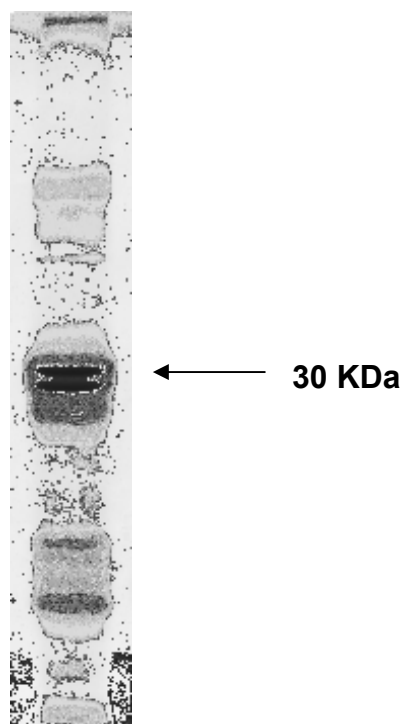


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % na presença de SDS e β -mercaptoetanol da fração PL (150 μ g). Gel corado com azul brilhante de Coomassie R-350 a 0,1 %.

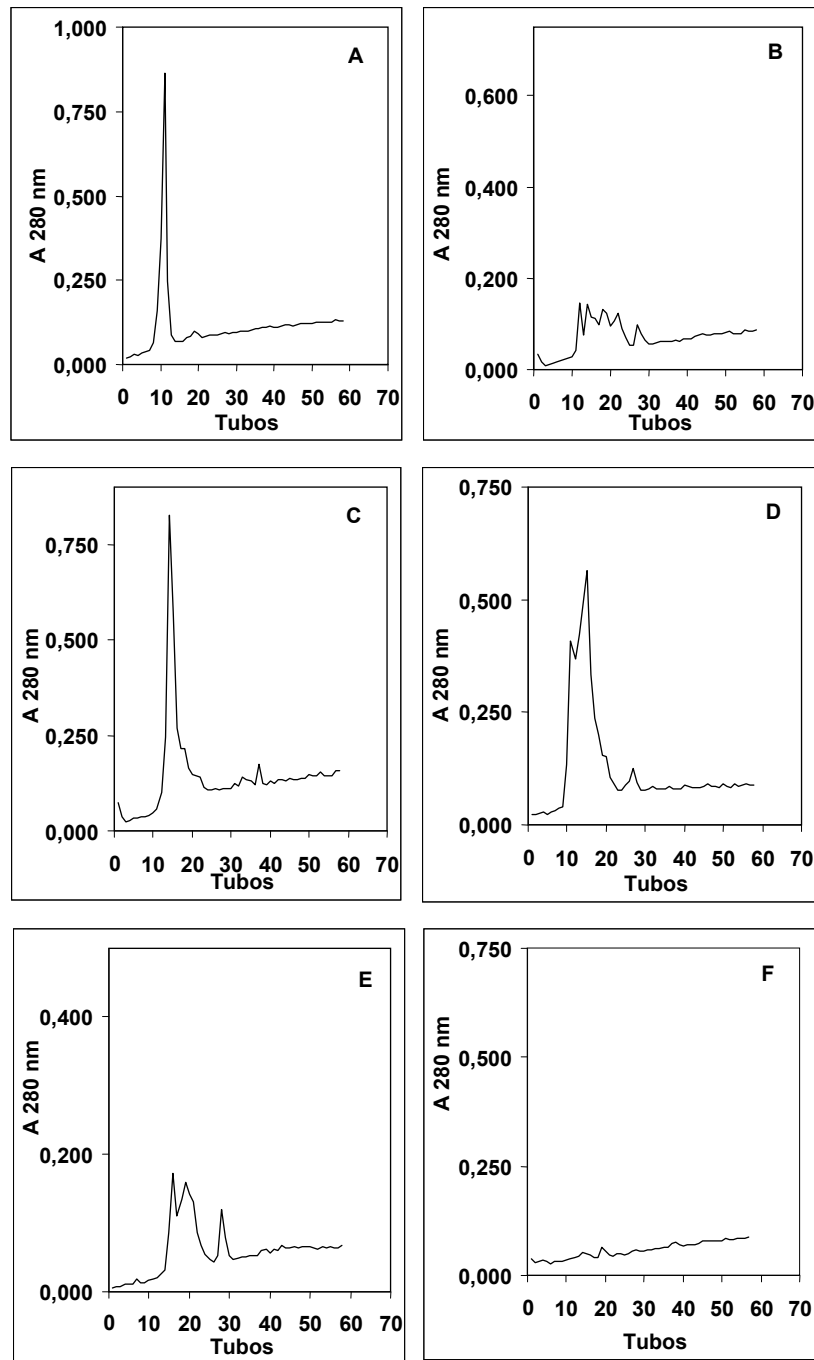


FIGURA 2 - Perfis cromatográficos típicos de filtração em gel de amostras não-digeridas e produtos da digestão da fração PL e BSA monitorados pelo sistema FPLC. (A) BSA não digerida, (B) produtos da digestão de BSA-tripsina, (C) PL não digeridas, (D) produtos da digestão de PL-tripsina, (E) produtos da digestão de PL-pepsina, (F) produtos da digestão de PL-protease de *S. griseus*. Taxa de filtração de 1 ml/min e frações de 2 ml coletadas.

TABELA 2 - Estimativa percentual da digestibilidade *in vitro* da fração PL comparada com BSA medida por cromatografia de filtração em gel

Enzimas				
Amostras	Tripsina	Quimiotripsina	Pepsina	Protease de <i>S. griseus</i>
PL	18 %	22 %	45 %	95 %
BSA	78 %	70 %	83 %	95 %

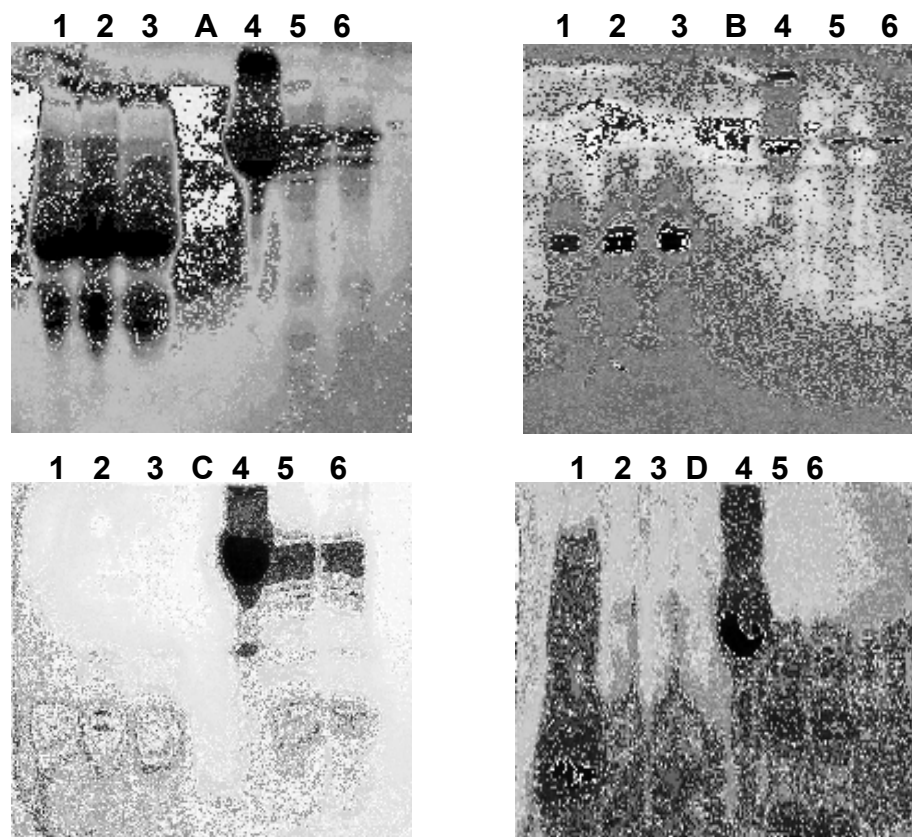


FIGURA 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % na presença de SDS e β -mercaptoetanol das amostras não-digeridas e produtos da digestão da fração PL e BSA por tripsina (A), quimiotripsina (B), pepsina (C) e protease de *S. griseus* (D). 1 - PL não-digeridas (40 μ g); 2,3 - PL digeridas pela respectiva enzima (40 μ g); 4 - BSA não-digerida (40 μ g); 5,6 - BSA digerida pela respectiva enzima (40 μ g). Géis corados com azul brilhante de Coomassie R-350 a 0,1 %.

O ensaio de digestibilidade *in vivo* da fração PL foi realizado por um período de 35 dias. A extensão da digestibilidade protéica foi investigada usando-se princípios imunoquímicos. Ratos experimentais consumiram a solução de PL numa quantidade diária comparável ao consumo de água pelos ratos do grupo controle. A ausência de mortalidade animal sugere que a amostra utilizada era destituída de toxicidade severa. O material fecal dos grupos controle e experimental teve seu conteúdo protéico estimado usando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Ambos os grupos apresentaram conteúdo protéico desprezível no material fecal (0,38 mg/ml e 0,30 mg/ml para os ratos controle e experimentais, respectivamente). A eletroforese dessas amostras demonstrou padrões muito semelhantes com duas bandas protéicas distintas, não muito evidentes, comuns aos ratos não-tratados e tratados (FIGURA 4).

O anti-soro policlonal de coelho produzido contra PL (anti-PL) apresentou reação cruzada com PL exibindo um padrão complexo de reconhecimento (FIGURA 5.C.D.E.F), mas não produziu reação cruzada com o material fecal e material fecal dialisado nos ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony usando-se concentrações variadas de anticorpos, material fecal e material fecal dialisado (FIGURAS 6, 7, 8 e 9). Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada entre PL e o soro não-imune de coelho quando submetidos a um ensaio sob condições idênticas (FIGURA 5.A.B).

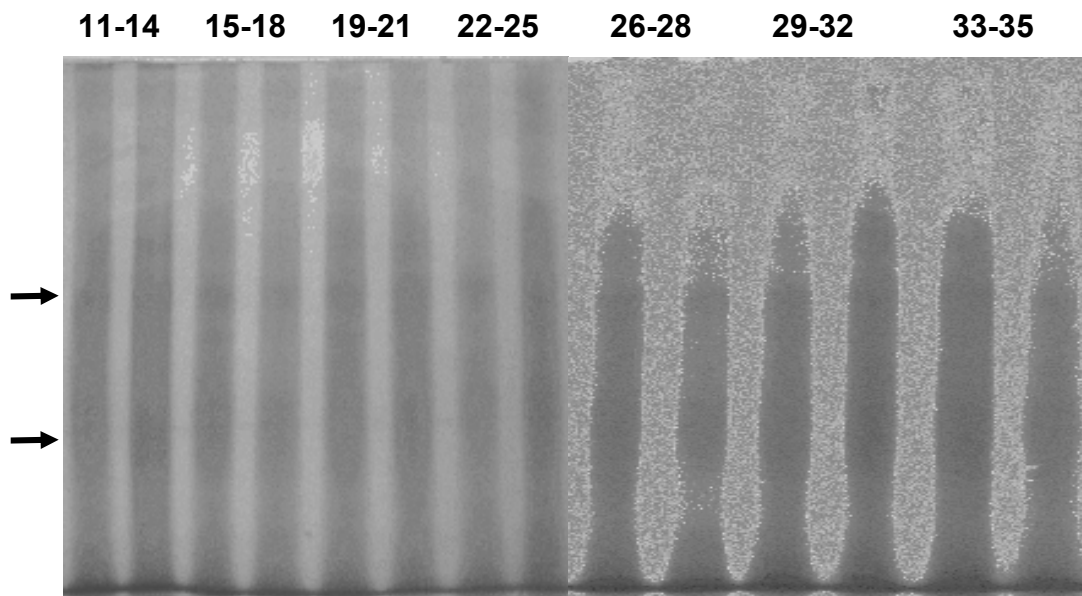


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % na presença de SDS e β -mercaptoetanol do material fecal (40 μ g em cada poço) dos grupos de ratos não-tratados e tratados com a fração PL durante 35 dias de experimento. Géis corados com azul brilhante de Coomassie R-350 a 0,1 %. Os números representam os intervalos de coleta das fezes e cada par de colunas consecutivas correspondem aos grupos controle e experimental, respectivamente. As setas indicam as duas mais proeminentes bandas eletroforéticas presentes ao longo dos dias em ambos os grupos.

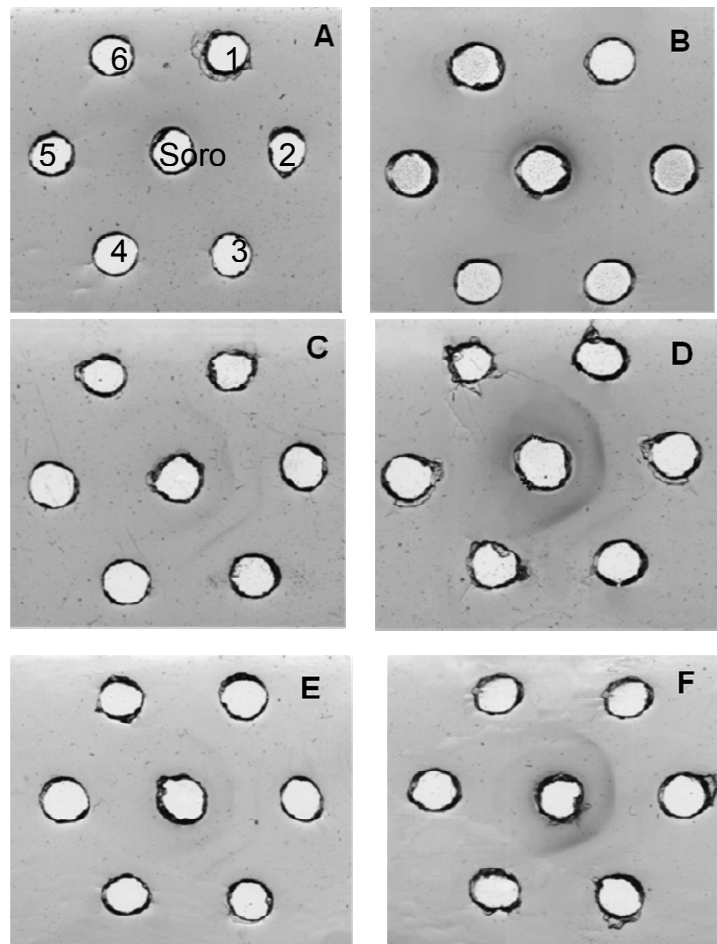


FIGURA 5 - Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony para verificação da produção de anticorpos pelo coelho com A: soro de coelho não-imune 17,5 mg/ml; B: soro de coelho não-imune 35 mg/ml; C: anti-soro de coelho imune 35 dias 17,5 mg/ml; D: anti-soro de coelho imune 35 dias 35 mg/ml; E: anti-soro de coelho imune 42 dias 17,5 mg/ml; F: anti-soro de coelho imune 42 dias 35 mg/ml (10 μ l/poços centrais) contra PL em diferentes concentrações (1- 1 mg/ml sem diluição e diluições 2- 1:2, 3- 1:10, 4- 1:20, 5- 1:40, 6- 1:80) (10 μ l/poços radiais).

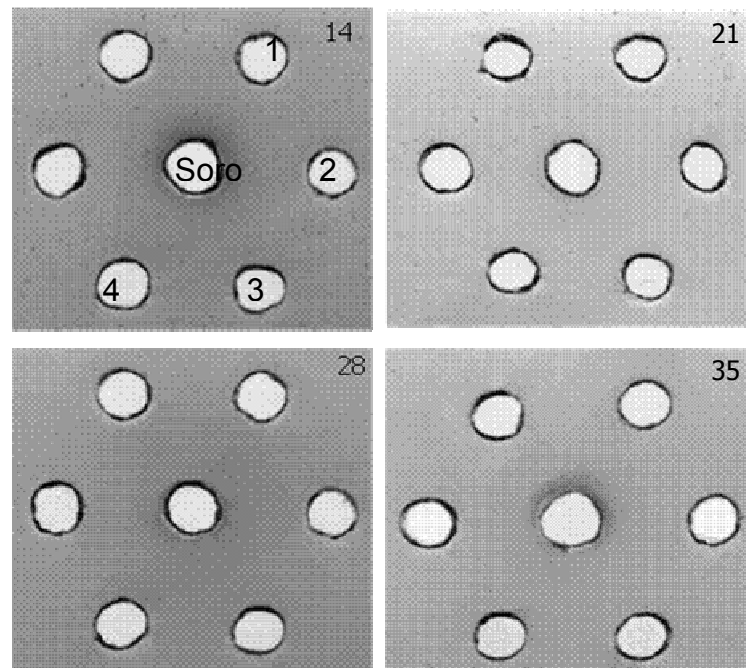


FIGURA 6 - Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune (42 dias) na concentração 35 mg/ml (10 μ l/poços centrais) contra o material fecal dos animais do grupo controle referente aos dias 14, 21, 28 e 35 em diferentes concentrações (1- 5 mg/ml; 2- 4 mg/ml; 3- 3 mg/ml e 4- 2 mg/ml) (10 μ l/poços radiais).

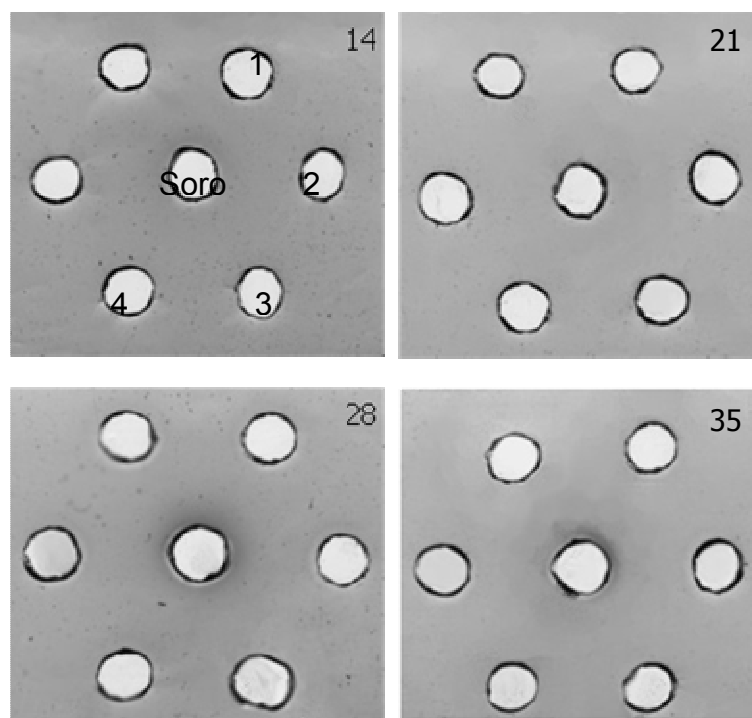


FIGURA 7 - Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune (42 dias) na concentração 35 mg/ml (10 μ l/poços centrais) contra o material fecal dialisado dos animais do grupo controle referente aos dias 14, 21, 28 e 35 em diferentes concentrações (1- 5 mg/ml; 2- 4 mg/ml; 3- 3 mg/ml e 4- 2 mg/ml) (10 μ l/poços radiais).

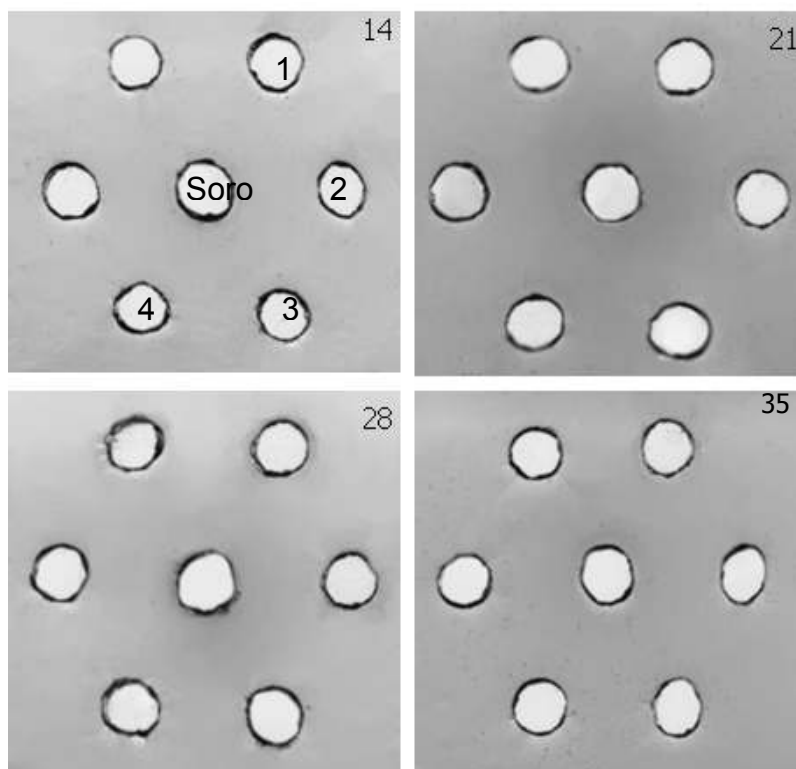


FIGURA 8 - Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune (42 dias) na concentração 35 mg/ml (10 μ l/poços centrais) contra o material fecal dos animais do grupo experimental referente aos dias 14, 21, 28 e 35 em diferentes concentrações (1- 5 mg/ml; 2- 4 mg/ml; 3- 3 mg/ml e 4- 2 mg/ml) (10 μ l/poços radiais).

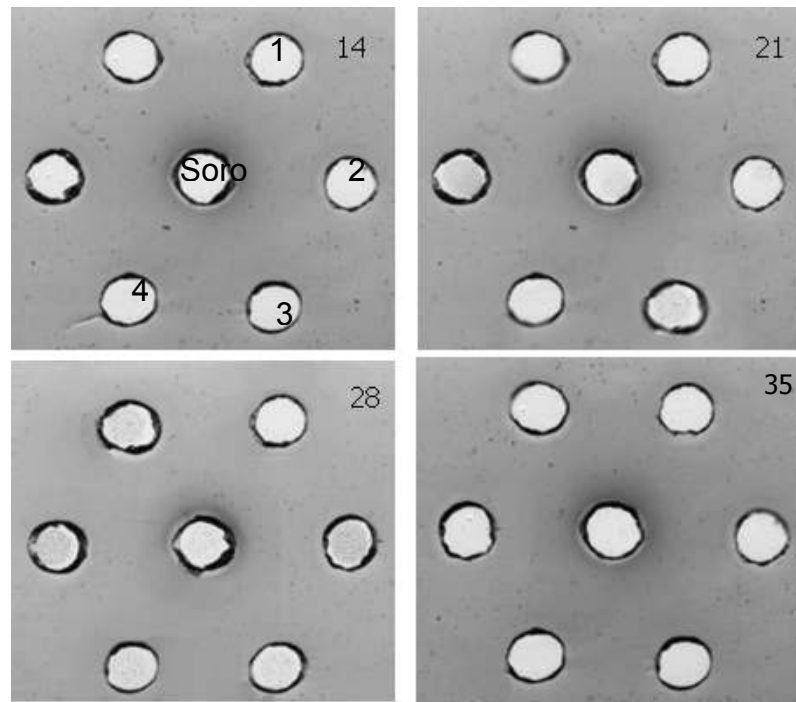


FIGURA 9 - Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony com anti-soro de coelho imune (42 dias) na concentração 35 mg/ml (10 μ l/poços centrais) contra o material fecal dialisado dos animais do grupo experimental referente aos dias 14, 21, 28 e 35 em diferentes concentrações (1- 5 mg/ml; 2- 4 mg/ml; 3- 3 mg/ml e 4- 2 mg/ml) (10 μ l/poços radiais).

4. Discussão

O procedimento descrito de coleta do látex minimiza os efeitos de “coagulação” que ocorrem no látex logo após sua coleta. Se coletada em sua forma *in natura*, a secreção tende a sofrer reações de oxidação e claramente há formação de pedaços (flocos) de borracha, característica comum de látex de plantas. Este fenômeno leva a uma grande perda de moléculas solúveis que são então aprisionadas nas partículas coaguladas.

A estratégia experimental desenvolvida tinha por objetivo responder às seguintes indagações: (1) as proteínas solúveis do látex de *C. procera* são passíveis de digestão por enzimas proteolíticas de mamíferos? (2) os efeitos tóxicos ou prejudiciais do látex de *C. procera*, descritos na literatura, são devido às atividades das suas proteínas?

As justificativas para estas indagações baseiam-se nos recentes resultados obtidos por nossa equipe de pesquisa, que demonstraram de forma inequívoca que a atividade antiinflamatória previamente descrita para o látex íntegro de *C. procera* está associada à fração PL, quando administrada por via intravenosa (ALENCAR *et al.*, 2004).

Posteriormente, a atividade antinociceptiva (analgésica) também foi mostrada estar na fração PL, ao ser administrada por via intraperitoneal (SOARES *et al.*, 2005). A partir destes resultados, tornou-se relevante o desenvolvimento de um estudo mais detalhado sobre a fração PL em seu mais amplo aspecto e dentre estes o estudo de sua digestibilidade.

Em trabalhos anteriores, autores descreveram efeitos tóxicos em animais resultantes do uso do látex íntegro de *C. procera*, através de diferentes vias de administração, inclusive a via oral. Entretanto, o presente trabalho objetivou avaliar a digestibilidade da fração protéica isolada como uma primeira abordagem indireta para estudar seus possíveis efeitos deletérios.

A análise da composição da fração PL sugere que uma possível resistência à hidrólise proteolítica não deve estar associada a pouca disponibilidade de sítios de clivagem para as enzimas utilizadas. Conteúdos percentuais de fenilalanina, tirosina, lisina e arginina, que representam potenciais sítios de clivagem para pepsina, tripsina e quimiotripsina, estão satisfatoriamente presentes nos hidrolisados utilizados para a análise.

A análise dos produtos de digestão da fração PL pelas enzimas proteolíticas animais, realizada por duas técnicas complementares (cromatografia e eletroforese), sugeriu que a fração PL foi parcialmente degradada *in vitro*. Embora as taxas de digestão tenham sido estimadas como inferiores a 50 %, deve ser considerado que a digestão da fração PL foi o resultado de uma única atividade enzimática por vez e não da ação enzimática seqüencial que ocorre no trato digestório dos animais.

Poderia ser especulado que a exposição sucessiva à pepsina, tripsina e quimiotripsina, assim como a endo- e exopeptidases intestinais, poderia contribuir efetivamente para a digestão mais completa da fração PL *in vivo*. O resultado do ensaio *in vitro* fornece subsídios para outros ensaios *in vivo* adicionais à medida que uma proteólise parcial foi evidenciada.

Com relação ao padrão eletroforético, cuja análise de digestibilidade foi considerada em termos subjetivos (análise visual), é importante mencionar que sendo a BSA uma proteína pura, suas bandas apareceram sempre intensas, mesmo quando digeridas, enquanto a digestão da fração PL foi mais bem visualizada. Este comentário seria para justificar a dificuldade em obter uma eletroforese com bandas protéicas mais definidas e de melhor qualidade.

Um exemplo dos relatos de toxicidade do látex de *C. procera* é de El Badwi e colaboradores (1998) que relataram que cabras recebendo doses orais de 1 ml/kg de massa corpórea/dia de látex íntegro de *C. procera* ou 0,005 ml/kg de massa corpórea/dia por via intravenosa ou por via intraperitoneal morreram entre 20 min e 4 dias após o início do tratamento. Além disso, o comportamento dos animais foi claramente alterado durante os tratamentos, demonstrando estado de sofrimento.

Já nessa pesquisa, ratos experimentais consumiram PL em solução por um período consecutivo de 35 dias, correspondendo a uma dose diária média de 206 mg/kg de massa corpórea. Nenhuma mudança comportamental foi observada durante as várias checagens diárias que foram realizadas. Para testar a digestibilidade da fração PL, amostras das fezes foram coletadas, agrupadas e liofilizadas. O material fecal mostrou ser quase livre de proteína, evidenciando que a absorção de proteínas da dieta comercial e daquelas do látex pelos ratos foi comparável àquela do grupo controle.

Pesquisas anteriores realizadas por nossa equipe mostraram que doses da fração PL tão altas quanto 100 mg/kg de massa corpórea, não somente foram destituídas da capacidade de induzir toxicidade aguda, mas promoveram

uma forte atividade antiinflamatória, por via intravenosa, em modelos de inflamação experimental em ratos (ALENCAR *et al.*, 2004).

Nossas tentativas atuais de estabelecer um protocolo para avaliar a existência ou não de efeitos alergênicos da fração PL e de outras frações derivadas do látex íntegro, indicaram que quando camundongos foram desafiados com PL e com uma fração rica em borracha nas doses de 10 mg/kg de massa corpórea por via oral, 75 % dos animais que receberam essa última morreram nas primeiras 24 h, enquanto nenhuma morte foi observada entre animais que receberam PL.

Esses dados suportam a evidência de que a toxicidade e os efeitos letais do látex de *C. procera* podem estar relacionados a outros compostos químicos, que são facilmente separados de sua fração protéica mais abundante através da centrifugação e diálise. É importante observar que nosso grupo de trabalho encontrou que as atividades antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2004) e analgésica (SOARES *et al.*, 2005) estão presentes na fração livre de borracha (PL), que não está associada com os efeitos tóxicos.

Como observado nos ensaios de imunodifusão, não foi possível a detecção de reação cruzada entre o anti-soro de PL e os materiais fecais. A ausência de reação cruzada nos materiais fecais que não foram dialisados sugere a ausência de proteínas íntegras e se há peptídeos derivados da digestão parcial de PL, estes não são mais reconhecidos pelos anticorpos policlonais. Já o material fecal submetido à diálise deve ser isento de peptídeos derivados da digestão parcial de PL. Em não havendo reação cruzada, conclui-se que não há PL íntegras nas amostras analisadas. Não é possível afirmar

que as proteínas foram completamente digeridas, entretanto, a não detecção da presença das mesmas nas fezes, sugere que estas ou foram digeridas e absorvidas, ou foram absorvidas em sua forma íntegra.

Em conclusão, os presentes dados indicam que a fração PL é parcialmente susceptível à proteólise em ensaios *in vitro* e não produz toxicidade visível em animais experimentais. Estes resultados fortalecem a hipótese deste trabalho de que a toxicidade severa observada em animais que ingeriram ou receberam doses de látex íntegro de *C. procera* deve ser devido, portanto, à sua fração borracha ou a outros compostos de baixa massa molecular, não estando relacionada às suas proteínas solúveis.

5. Referências bibliográficas

AKHTAR, N.; MALIK, A.; ALI, S.N.; KAZMI, S.U. Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2821-2824, 1992.

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

AL-QARAWI, A.A.; MAHMOUD, O.M.; SOBAIH; HAROUN, E.M.; ADAM, S.E. A preliminary study on the anthelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. **Vet. Res. Commun.**, v. 25, n. 1, p. 61-70, 2001.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, v. 336, p. 93-104, 1984.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHITME, H.R.; CHANDRA, M.; KAUSHIK, S. Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. in experimental animals. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 70-75, 2004.

EL BADWI, S.M.A.; ADAM, S.E.; SHIGIDI, M.T.; HAPKE, H.J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 105, p. 425-427, 1998.

EL SHEIKH, H.A.; ALI, B.H.; HOMEIDA, A.M.; HASSAN, T.; IDRIS, O.F.; HAPKE, H.J. The activities of drug-metabolizing enzymes in goats treated orally with the latex of *Calotropis procera* and the influence of dieldrin pretreatment. **J. Comp. Pathol.**, v. 104, n. 3, p. 257-268, 1991.

HOWARD-JONES, N. A CIOMS ethical code for animal experimentation. **WHO Chron.**, v. 39, n. 2, p. 51-56, 1985.

KAREEM, S.O.; AKPAN, I.; OSHO, M.B. *Calotropis procera* (Sodom apple) - a potential material for enzyme purification. **Bioresour. Technol.**, v. 87, n. 1, p. 133-135, 2003.

KHAN, A.Q.; MALIK, A. A steroid from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2859-2861, 1989.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 115-118, 2001.

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

LI, D.D.; HE, S.H. Plant allergic proteins and their biological functions. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao**, v. 35, n. 9, p. 789-792, 2003.

MAHMOUD, O.M.; HAROUN, E.M.; SOBAIH, M.A.; OMER, O.H.; ADAM, S.E.I. Comparative efficacy of *Calotropis procera* latex and sulfadimidine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidalis* infection in Najdi lambs. **Small Ruminant Res.**, v. 42, n. 2, p. 135-140, 2001.

MEKKRIENGKRAI, D.; UTE, K.; SWIEZEWSKA, E.; CHOJNACKI, T.; TANAKA, Y.; SAKDAPIPANICH, J.T. Structural characterization of rubber from jackfruit and euphorbia as a model of natural rubber. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 2013-2019, 2004.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis*. Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol. Plantarum**, v. 26, p. 113-120, 1984.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **II Program Allergy**, v. 6, p. 30-154, 1962.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUVEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potencial of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 261-266, 1999.

RIOS, F.J.B.; CAVADA, B.S.; MEDEIROS, D.A.; MOREIRA, R.A.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* Genera. **Lectins: Biol. Biochem. Clin. Biochem.**, v. 11, p. 277-284, 1996.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* - a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 219-224, 2000.

SOARES, P.M.; LIMA, S.R.; MATOS, S.G.; ANDRADE, M.M.; PATROCÍNIO, M.C.A.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V.; CRIDDLE, D.N.; CARDI, B.A.; CARVALHO, K.M.; ASSREUY, A.M.; VASCONCELOS, S.M.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 125-129, 2005.

WITITSUWANNAKUL, D.; CHAREONTHIPHAKORN, N.; PACE, M.; WITITSUWANNAKUL, R. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. **Phytochemistry**, v. 61, n. 2, p. 115-121, 2002.

CAPÍTULO III

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*

ÍNDICE	Página
1. Introdução.....	81
2. Materiais e métodos.....	83
2.1. Materiais.....	83
2.2. Equipamentos.....	84
2.3. Animais.....	84
2.4. Preparo da amostra.....	85
2.5. Avaliação da toxicidade subcrônica das proteínas do látex.....	85
2.5.1. Análises bioquímicas séricas.....	87
2.5.2. Contagens total e diferencial de leucócitos sangüíneos e do fluido peritonial.....	87
2.5.3. Tratamento dos soros.....	88
2.5.4. Eletroforese das proteínas séricas.....	89
2.6. Avaliação da toxicidade aguda das proteínas do látex.....	90
2.7. Análise estatística.....	91
3. Resultados.....	91
4. Discussão.....	106
5. Referências bibliográficas.....	116

1. Introdução

As plantas constituem a matéria-prima mais explorada para a produção de benefícios para o homem e animais, principalmente nas áreas da agricultura e da indústria. Ao longo do tempo, os seres humanos procuraram por propriedades alimentícias ou curativas nas sementes, caules, raízes e folhas das plantas (DUA *et al.*, 2004; OSADEBE, OKIDE e AKABOGU, 2004; SCHMALKO e ALZAMORA, 2005).

Atualmente, várias plantas são usadas como medicamentos alternativos, embora muitos de seus princípios farmacológicos permaneçam desconhecidos. As plantas lactíferas aparecem como uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas, como parece ser o caso da planta *Calotropis procera* (TAHIR e CHI, 2002). Seu uso no combate a diferentes enfermidades e a detecção de propriedades biológicas relevantes têm sido confirmados por vários pesquisadores (KUMAR *et al.*, 2001; ALENCAR *et al.*, 2004; VOULDOUKIS *et al.*, 2004).

O látex de *C. procera* ocorre abundantemente em suas partes verdes e pode ser facilmente coletado sem causar sérios danos à planta. Além disso, a vasta distribuição dessa espécie nas áreas tropicais, principalmente nos países subdesenvolvidos, contribuiu para a sua exploração medicinal (MARKOUK *et al.*, 2000).

A planta pertence à família Asclepiadaceae embora Sennblad e Bremer (2002) tenham recentemente proposto sua inclusão como um membro da família Apocynaceae. O látex de *C. procera* possui proteases e cardenolídeos,

entre outras moléculas interessantes (SING e RASTOGI, 1972; SEIBER, NELSON e LEE, 1982; DUBEY e JAGANNADHAM, 2003).

Muitos relatos descrevem o uso popular do látex de *C. procera*. Tem sido documentado por pessoas da região local (Nordeste do Brasil) que o látex é usado topicamente como analgésico para diminuir a dor de dente e para combater uma infecção dérmica comum provocada por fungo, havendo ainda, relatos mencionando a sua ingestão oral após diluição em água para controlar o nível de glicose sangüínea.

Essas práticas contradizem descrições sobre a toxicidade do látex íntegro, assim como as reações alérgicas que são de ocorrência comum nos fluidos lactíferos (SUSSMAN, BEEZHOLD e LISS, 2002). Essas informações conflitantes devem, portanto, ser investigadas, pois o látex de *C. procera* é indubitavelmente uma fonte interessante de princípios ativos envolvidos nas atividades inflamatória e antiinflamatória, analgésica e curativa (RASIK *et al.*, 1999; DEWAN, SANGRAULA e KUMAR, 2000; KUMAR e SHIVKAR, 2004; ARYA e KUMAR, 2005).

Recentemente, nossa equipe de pesquisa fracionou o látex íntegro de *C. procera* em diferentes frações, baseando-se na solubilidade em água e tamanho molecular. Esse procedimento permitiu a separação de quase todas as proteínas solúveis da fração borracha do látex e de pequenos metabólitos. A principal fração protéica mostrou reter as atividades antiinflamatória (por via intravenosa) e antinociceptiva (por via intraperitoneal) reportadas ocorrer no látex íntegro (ALENCAR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2005). Seria de grande relevância identificar se essa fração protéica responsável pela antiinflamação e

antinocicepção está envolvida com a toxicidade do látex. Portanto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade subcrônica e aguda da principal fração protéica extraída do látex de *C. procera*.

No intuito de avaliar o envolvimento das proteínas do látex em efeitos tóxicos do látex íntegro, já relatados, o látex após coletado foi fracionado por diálise e centrifugação. Sua principal fração protéica foi administrada por via oral a animais experimentais em ensaios tóxicos subcrônico e agudo. As funções hepática e renal e outros parâmetros bioquímicos séricos, composição celular sangüínea e peritoneal, além da taxa de desempenho de crescimento dos animais e massa relativa de órgãos vitais foram avaliados no ensaio subcrônico. A monitoração de alterações comportamentais de animais experimentais foi realizada em ambos os ensaios subcrônico e agudo.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As determinações séricas de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina foram realizadas através do uso de kits (Labtest Diagnostica, Vista Alegre, MG, Brasil).

Reagente de Türk foi adquirido da Merck, Darmstadt, Germany. Conjunto para coloração rápida em hematologia (panótico rápido) visando a

contagem diferencial de leucócitos foi adquirido da Laborclin, Pinhais, PR, Brasil.

Albumina sérica bovina (BSA) fração V, azul brilhante de Coomassie G-250, acrilamida, N, N' metileno bis-acrilamida, N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina (TEMED), dodecil sulfato de sódio, β -mercaptoetanol e azul brilhante de Coomassie R-350 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. Coluna Sephadex G-25 (PD-10) foi obtida da GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, United Kingdom. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Equipamentos

Liofilizador L4KR, EDWARDS Alto Vácuo, BOC do Brasil Ltda. Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys CAT 4001/4, Spectronic Instruments. Câmara hemocitométrica (Câmara de Neubauer dupla espelhada, Neubauer Improved Brightline, Optik Labor). Microscópio óptico binocular 106.2, Quimis. Citocentrífuga microprocessada 2000 D, Cientec. Contador mecânico, Elo's. Espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare.

2.3. Animais

O ensaio tóxico subcrônico foi desenvolvido usando-se ratos (*Rattus norvegicus*), Wistar, fêmeas, com 2 meses de idade, e 150 – 200 g de massa

corpórea. O ensaio tóxico agudo foi desenvolvido usando-se ratos (*Rattus norvegicus*), Wistar, machos e fêmeas, com 2 meses de idade, e 150 – 200 g de massa corpórea. Os animais, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. A manutenção e o manuseio dos animais foram realizados nas mesmas condições já descritas anteriormente (item 2.3 – CAPÍTULO II).

2.4. Preparo da amostra

O látex foi coletado e fracionado seguindo os mesmos procedimentos já descritos anteriormente (itens 2.4 e 2.5 – CAPÍTULO II). O sobrenadante rico em proteínas solúveis, límpido e completamente livre de borracha (totalmente precipitada por insolubilidade em água), denominado de proteínas do látex (PL), foi diluído em água potável (1:2, v/v) e usado imediatamente nos experimentos de avaliação da toxicidade subcrônica ou liofilizado e armazenado até posterior utilização nos ensaios de avaliação da toxicidade aguda.

2.5. Avaliação da toxicidade subcrônica das proteínas do látex

Dois experimentos idênticos de avaliação da toxicidade subcrônica foram realizados, com o mesmo desenho experimental já descrito para o

ensaio de digestibilidade *in vivo* no capítulo de aspectos bioquímicos (item 2.10 – CAPÍTULO II), com os seguintes procedimentos e análises adicionais.

Todos os ratos foram mantidos em jejum por aproximadamente 16 h antes de cada coleta sangüínea no primeiro experimento e esse procedimento foi anulado no segundo experimento. Amostras sangüíneas foram coletadas via plexo retro-orbital, sob leve anestesia de éter, nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 do período teste. Nos mesmos intervalos, os ratos foram pesados individualmente (os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m. de 7 repetições), e as amostras sangüíneas foram usadas para determinação de glicose sangüínea, contagens total e diferencial de leucócitos sangüíneos (no primeiro experimento, essas contagens foram realizadas somente no 35° dia), e análise por eletroforese das proteínas séricas.

Ao final do período experimental, foram realizadas várias dosagens bioquímicas séricas. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e contagens total e diferencial de leucócitos da cavidade peritoneal foram executadas. As células presentes nessa cavidade foram coletadas através da lavagem da mesma injetando-se 10 ml de salina contendo 5 UI/ml de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 7 ml de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur de plástico.

Os animais tiveram seus órgãos vitais (fígado, rins, baço, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e estômago) dissecados e as massas frescas relativas (massa fresca relativa = (massa do órgão fresco/massa do

animal) x 100) foram determinadas. Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m. de 7 repetições.

2.5.1. Análises bioquímicas séricas

A determinação do teor de glicose sangüínea foi realizada pelo método colorimétrico da glicose oxidase (Labtest Diagnostica, Vista Alegre, MG, Brasil). Todas as outras análises bioquímicas séricas: determinações de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos, testes da função hepática (determinações de proteínas totais e albumina e atividades das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)) e testes da função renal (determinações de uréia e creatinina) foram realizadas através de métodos colorimétricos padronizados disponíveis comercialmente com a utilização de kits diagnósticos comerciais (Labtest Diagnostica, Vista Alegre, MG, Brasil). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m. de 7 repetições.

2.5.2. Contagens total e diferencial de leucócitos sangüíneos e do fluido peritonal

As contagens total e diferencial de leucócitos sangüíneos e do fluido peritonal foram realizadas com base no método de Souza e Ferreira (1985). Do sangue ou exsudato peritonal colhido de cada animal, 20 μ l foram diluídos em 380 μ l do reagente de Türk (1:20, v/v), sob agitação vigorosa e usados

respectivamente para contagem total de leucócitos sangüíneos e do fluido peritoneal em câmara hemocitométrica por microscopia óptica.

A contagem diferencial dos leucócitos sangüíneos e do fluido peritoneal foi realizada preparando-se esfregaços com 25 µl do sangue ou exsudato peritoneal colhido de cada animal, sendo estes corados através da utilização de um conjunto para coloração rápida em hematologia (Panótico Rápido, constituído pela solução fixadora de triarilmetano a 0,1 %, solução corante de xantenos a 0,1 % e solução corante de tiazinas a 0,1 %), ou no caso do fluido peritoneal, primeiramente citocentrifugados a 2.800 x *g*, por 10 min, a 25 °C e, em seguida, corados como citado acima.

Os tipos de leucócitos foram contados em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão (aumento de 100 vezes), com um contador mecânico, onde foi contado um total de 100 células por lâmina. O número total de neutrófilos/mononucleadas foi estimado multiplicando-se o percentual encontrado destas células (contagem diferencial) pelo número total de leucócitos (contagem total) e os resultados encontrados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de neutrófilos/mononucleadas/mm³ do sangue/fluido peritoneal de 7 repetições.

2.5.3. Tratamento dos soros

Com os soros dos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dos animais do primeiro experimento foi produzido um *pool* (por grupo/por dia). O volume de cada *pool* foi completado para 2,5 ml com NaCl 0,15 M. Cada *pool* foi submetido à

cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-25 (PD-10, GE Healthcare) objetivando a dessalinização e exclusão de moléculas de baixa massa molecular do *pool* de soro. Foram coletadas as frações 1 e 2, pois apresentaram absorbâncias altas (superiores a 0,1 em 280 nm) (frações contendo proteínas séricas) de cada cromatografia que foram então liofilizadas.

2.5.4. Eletroforese das proteínas séricas

Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras foi realizada com as proteínas dos soros liofilizados de cada intervalo de coleta dos dois grupos de animais. Os experimentos envolvendo eletroforese foram todos efetuados seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), como citado anteriormente (item 2.7 – CAPÍTULO II) com as seguintes diferenças.

Amostras de 1 mg das proteínas séricas (frações 1 ou 2 dos soros liofilizados) de cada intervalo de coleta dos dois grupos de animais foram dissolvidas em 0,5 ml do tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 2 % de SDS e 5 % de β -mercaptoetanol) e preparadas para a corrida eletroforética como descrito antes (item 2.7 – CAPÍTULO II).

Amostras de 5 μ l foram aplicadas no interior do gel de aplicação, correspondendo a 10 μ g de proteínas séricas em cada poço do gel.

2.6. Avaliação da toxicidade aguda das proteínas do látex

Com o objetivo de avaliar a existência ou não de toxicidade aguda da fração PL por via oral, ensaios para a determinação da dose letal 50 % (DL₅₀) (quantidade da substância capaz de causar a morte em 50 % dos animais de uma determinada população) pelo método dos probitos, através de regressão linear da relação entre os probitos obtidos e o logaritmo da dose utilizada segundo Litchfield e Wilcoxon (1949), foram desenvolvidos de acordo com Britto (1994).

Dois grupos de seis ratos Wistar foram separados em grupos controle e experimental e utilizados nos ensaios. A fração PL foi administrada por *gavage* em dose única de 2.500 mg/kg de massa corpórea, dissolvida em 2 ml de solução de NaCl 0,15 M/animal. Os animais controle receberam somente 2 ml de solução de NaCl 0,15 M/animal. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e ração e foram mantidos no laboratório a 25 °C. Para a dose testada, os animais foram continuamente observados durante os primeiros 180 min e depois a cada 24 h, pelo prazo de 3 dias. Neste período, alterações comportamentais nos animais foram monitoradas, como: alteração na atividade locomotora, movimentos estereotipados, tremores, convulsões, sedação, contorções abdominais, diarreia, coma e morte.

2.7. Análise estatística

A significância das diferenças entre dois grupos foi analisada pelo teste *t* de Student não-pareado. As diferenças entre as médias dos múltiplos grupos foram analisadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do GraphPad Prism Software versão 4.0 (San Diego, CA).

3. Resultados

Uma fração protéica altamente solúvel do látex de *C. procera* foi preparada para a utilização por via oral em animais experimentais. De acordo com o protocolo de preparação da amostra, é sabido que a mesma é completamente livre de borracha, pois a fração poliisopreno foi eliminada pelos passos combinados de diálise e centrifugação. A diálise realizada com membranas com ponto de corte de 8.000 Da também preveniu a retenção de pequenos metabólitos que naturalmente ocorrem no látex incluindo: os cardenolídeos, carbonatos ou aminoácidos livres e pequenos peptídeos assim como mono- ou oligossacarídeos hidrossolúveis e substâncias derivadas de fenóis entre outros constituintes de baixas massas moleculares. Essa fração já provou ser rica em proteínas através de análise por eletroforese em gel de

poliacrilamida e o conteúdo de proteína bruta chega a 74 % como determinado pelo método de Kjeldahl, e previamente reportado (ALENCAR *et al.*, 2004).

O ensaio de toxicidade subcrônica da fração PL foi realizado em um período experimental de 35 dias. Os ratos experimentais consumiram a solução de PL em uma forma diária comparável ao consumo de água dos ratos controle. De acordo com o volume médio diário consumido de amostra por cada animal no grupo experimental e com a concentração de PL da amostra oferecida aos animais (2,5 mg/ml) (BRADFORD, 1976), foi estimado um consumo diário de 36 mg de PL por cada animal. Isso corresponde a aproximadamente 206 mg/kg de massa corpórea do animal. Os animais que receberam a fração PL diluída em água potável (2,5 mg/ml) (BRADFORD, 1976), concomitantemente à ração comercial, não apresentaram quaisquer mudanças comportamentais detectáveis em comparação aos animais controle que receberam somente água potável. Nenhuma morte foi documentada e ao final do experimento, todos os animais estavam aparentemente saudáveis.

Deve ser enfatizado que durante o período experimental, os animais que receberam a fração PL não tiveram acesso à água pura. Na FIGURA 1, está resumido o consumo diário de água e da solução de PL, e na FIGURA 2, o ganho de massa corpórea registrado semanalmente, de ambos os grupos experimentais.

O nível de glicose sangüínea, registrado semanalmente, dos ratos tratados com látex não diferiu daquele determinado no grupo controle (FIGURA 3). Os níveis séricos de triglicérides, HDL-colesterol e colesterol total foram determinados nas amostras sangüíneas no 35º dia. Como visualizado na

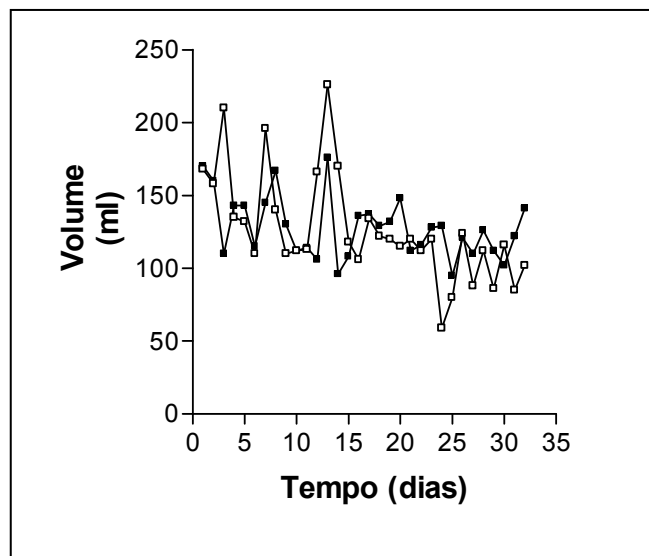


FIGURA 1 - Consumo diário de água (□) ou de PL (■) por grupos de ratos durante 35 dias de experimento. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

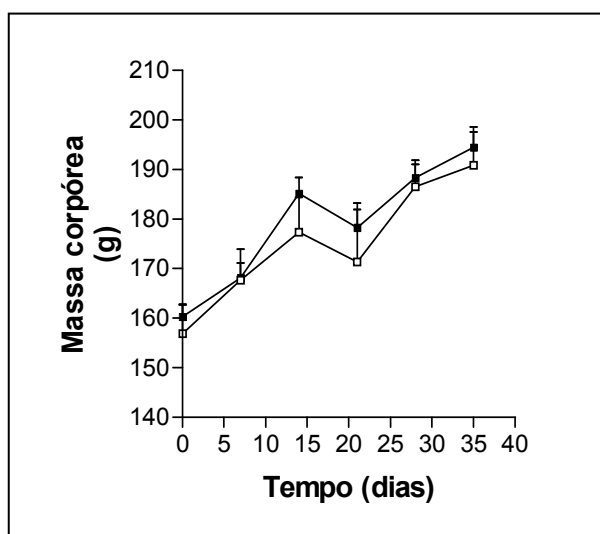


FIGURA 2 - Massas corpóreas de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■), registradas semanalmente durante 35 dias de experimento. Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

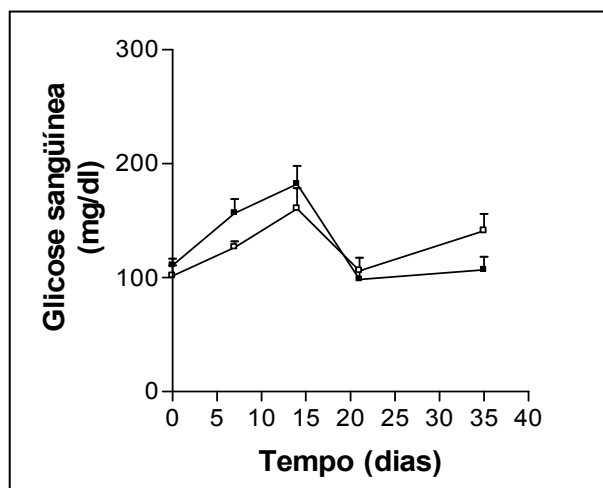


FIGURA 3 - Níveis de glicose sangüínea de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■). Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

TABELA 1, ambos os grupos de animais apresentaram padrões muito similares. Os teores séricos das proteínas totais, inclusive a albumina mostraram-se semelhantes entre os animais assim como as atividades enzimáticas da alanina amino transferase (ALT) e da aspartato amino transferase (AST) ao final do experimento (TABELA 1), indicando que houve preservação da função hepática durante o experimento. Do mesmo modo, os padrões protéicos eletroforéticos dos soros dos animais controle e experimental exibiram perfis muito similares (FIGURA 4).

Os níveis de creatinina e uréia também foram investigados no sangue no 35º dia (TABELA 1). Os ratos que receberam a fração PL exibiram valores muito semelhantes aos do grupo controle, para ambos os parâmetros mensurados, sugerindo que as funções renais foram preservadas ao longo do tratamento.

Quando sacrificados, os animais foram dissecados com o objetivo de coletar órgãos vitais que foram individualmente pesados e as massas frescas relativas determinadas. Os dados resumidos na TABELA 2 mostram que nenhuma alteração de massa foi observada no fígado, rins, baço, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e estômago, quando esses órgãos foram comparados. Além disso, nenhuma anormalidade foi visualmente detectada nos órgãos e vísceras (FIGURAS 5 e 6).

Com relação ao perfil celular de fluidos corpóreos, os eritrócitos sangüíneos mostraram estar morfológica e quantitativamente normais (dados não mostrados). Os fluidos peritoniais (FIGURA 7) dos ratos controle e

TABELA 1 - Níveis das análises bioquímicas séricas de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL

Análises bioquímicas séricas	Grupos	
	Controle	Experimental
Colesterol total	58,94 ± 7,06	56,25 ± 7,58
HDL-colesterol	44,97 ± 4,45	38,21 ± 4,13
Triglicerídeos	47,29 ± 17,26	53,08 ± 20,00
Proteínas totais	7,22 ± 0,76	7,83 ± 0,44
Albumina	3,89 ± 0,34	3,78 ± 0,33
Alanina aminotransferase (ALT)	31,04 ± 8,20	28,47 ± 10,79
Aspartato aminotransferase (AST)	106,16 ± 26,99	99,40 ± 21,51
Uréia	55,10 ± 5,47	51,79 ± 5,05
Creatinina	0,77 ± 0,08	0,78 ± 0,04

Cada dado representa a média ± e.p.m. de sete animais. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

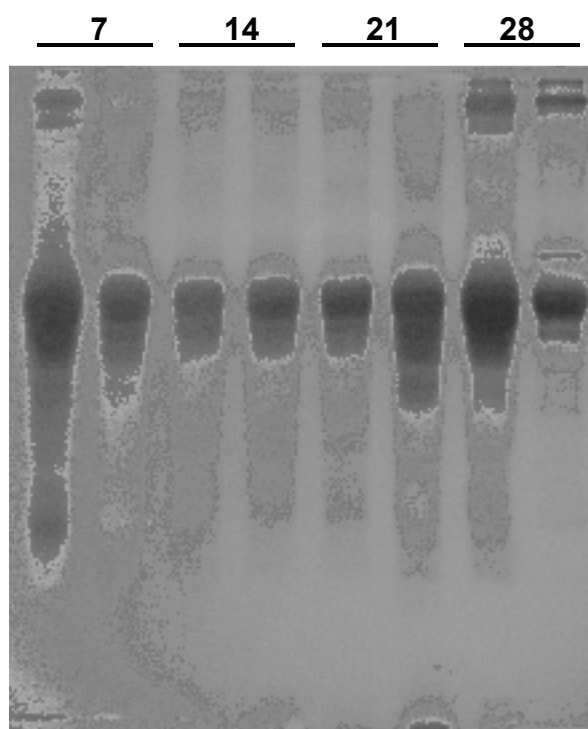


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % na presença de SDS e β -mercaptoetanol das proteínas séricas (10 μ g em cada poço) de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL durante 35 dias de experimento. Gel corado com azul brilhante de Coomassie R-350 a 0,1 %. Os números representam os intervalos de coleta dos soros (7, 14, 21 e 28 dias) e cada par de colunas consecutivas corresponde aos grupos controle e experimental, respectivamente.

TABELA 2 - Massas frescas relativas * (g) dos órgãos de grupos de ratos não-tratados e tratados com PL

Órgãos	Grupos	
	Controle	Experimental
Fígado	3,07 ± 0,47	3,26 ± 0,17
Rins	0,72 ± 0,16	0,82 ± 0,06
Baço	0,32 ± 0,17	0,27 ± 0,04
Intestino delgado	2,57 ± 0,46	2,74 ± 0,12
Intestino grosso	0,93 ± 0,29	1,03 ± 0,25
Pâncreas	0,17 ± 0,10	0,18 ± 0,09
Estômago	0,71 ± 0,21	0,87 ± 0,08

Cada dado representa a média ± e.p.m. de sete animais. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$). * Massa fresca relativa = (massa do órgão fresco/massa do animal) x 100.

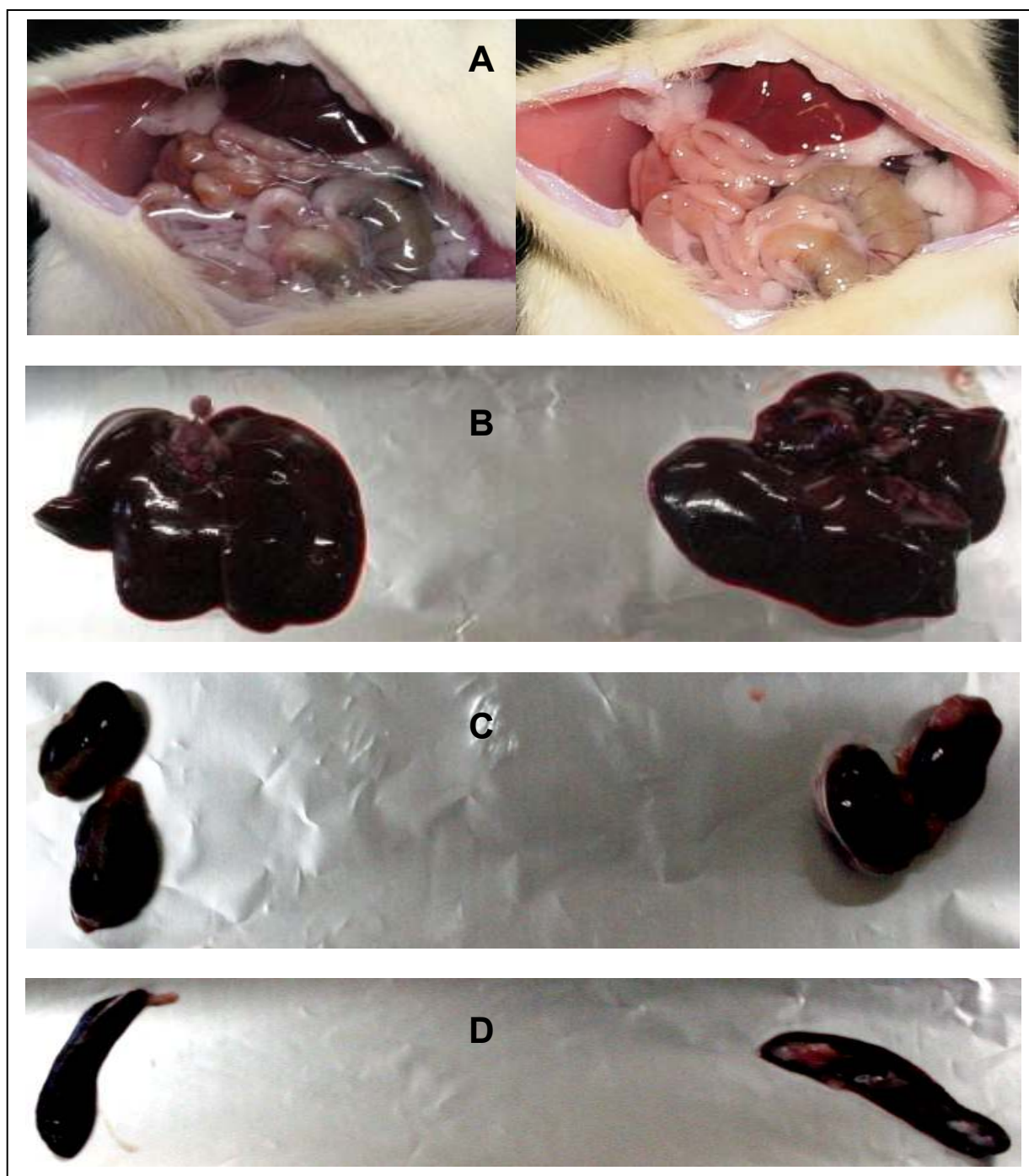


FIGURA 5 - A: Cavidade abdominal; B: fígado; C: rins e D: baço de ratos não-tratados (esquerda) e tratados (direita) com PL.

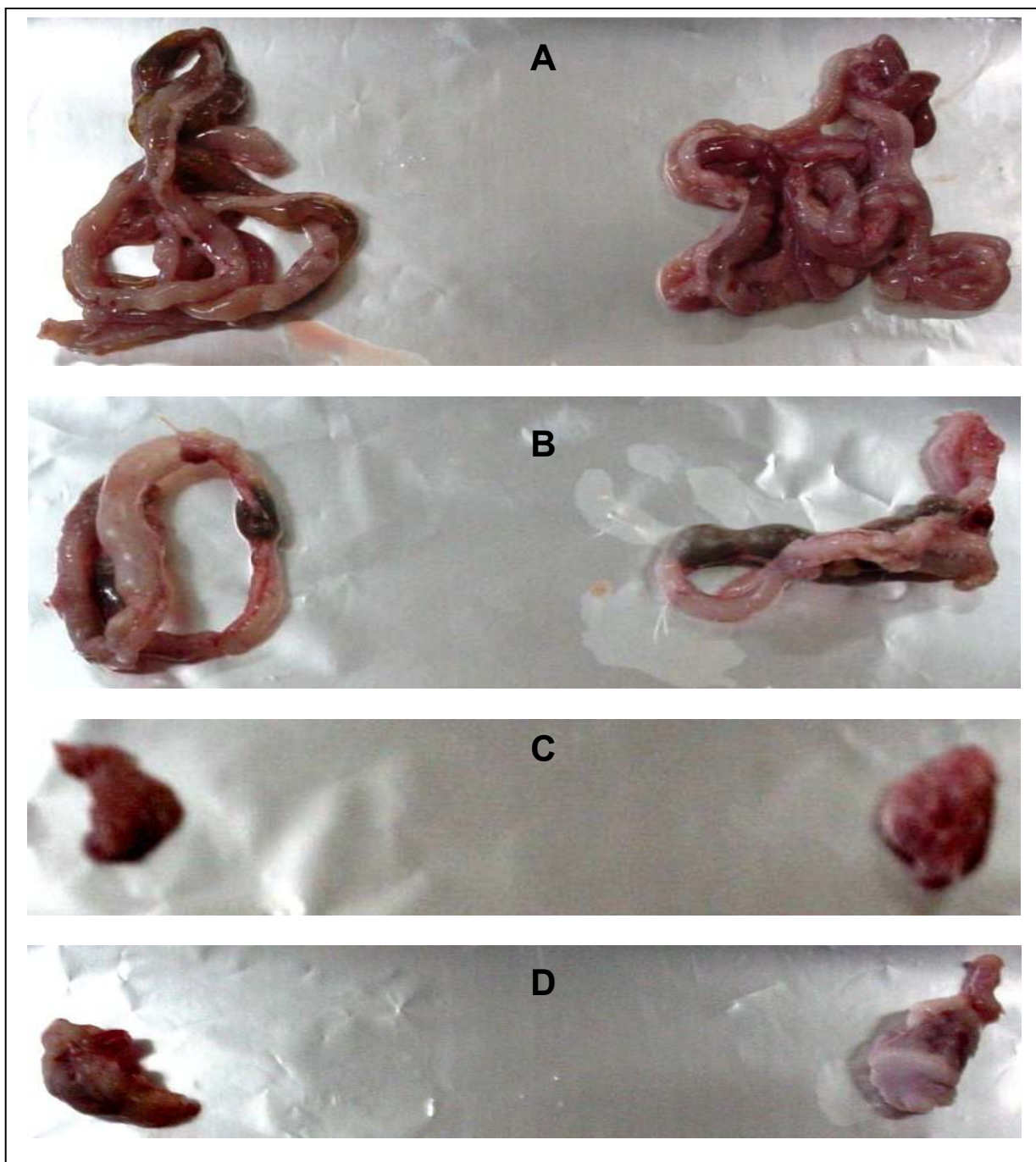


FIGURA 6 - A: intestino delgado; B: intestino grosso; C: pâncreas e D: estômago de ratos não-tratados (esquerda) e tratados (direita) com PL.

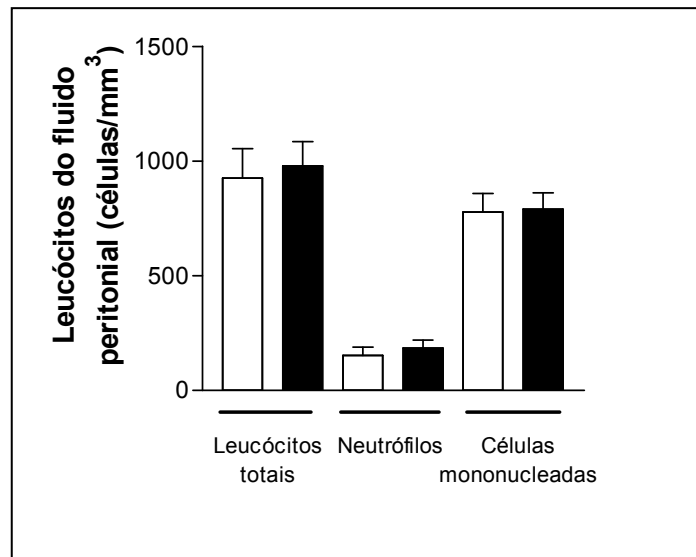


FIGURA 7 - Contagem total e diferencial de leucócitos do fluido peritoneal de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste de ANOVA unidirecional e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foram aplicados em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

experimentais apresentaram números semelhantes de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleadas.

Um dos resultados mais relevantes foi encontrado no perfil celular sangüíneo dos animais controle e experimental e mostrou que o número total de leucócitos foi diferente (FIGURA 8). A observação mais notável foi que somente as células mononucleadas apresentaram discrepâncias quando comparados o grupo controle e experimental, enquanto a população de neutrófilos permaneceu semelhante entre os dois grupos.

Pelo fato da determinação do perfil celular sangüíneo não ter sido previamente pensada e, portanto, somente verificada ao final do experimento (35° dia), um outro experimento seguindo exatamente o mesmo protocolo foi executado. Durante o segundo experimento, as amostras sangüíneas foram coletadas semanalmente pelo plexo retro-orbital e contagens total e diferencial de leucócitos foram determinadas.

Como pode ser observado na FIGURA 9, os leucócitos totais de ambos os grupos variaram ao longo do período experimental. Porém, no 35° dia (final da 5ª semana), os valores para ambos os grupos foram estatisticamente semelhantes, diferindo do primeiro experimento (FIGURA 8). Deve ser notado, contudo, que o efeito proliferativo da fração PL sobre os leucócitos foi observado mais cedo (2ª semana), quando as contagens dos leucócitos foram estatisticamente diferentes do dia zero (14° dia). Além disso, no 21° dia (3ª semana), o efeito foi estatisticamente diferente dos dados correspondentes ao 21° dia do grupo controle.

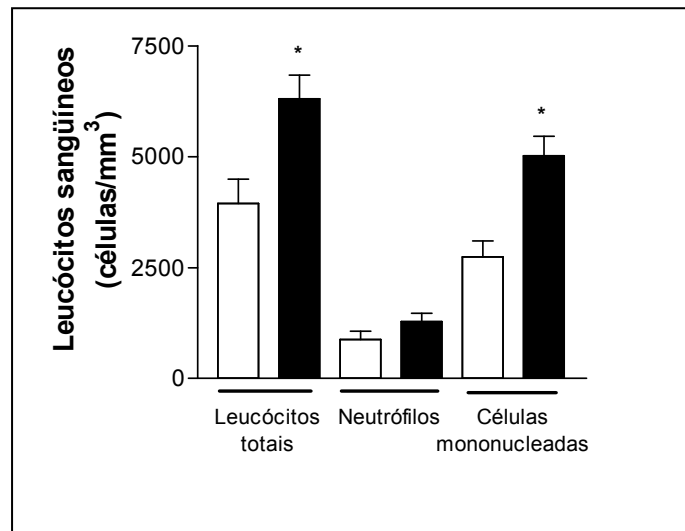


FIGURA 8 - Contagem total e diferencial de leucócitos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste de ANOVA unidirecional e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foram aplicados em todos os resultados. *P < 0,01, significativamente diferente dos ratos não-tratados.

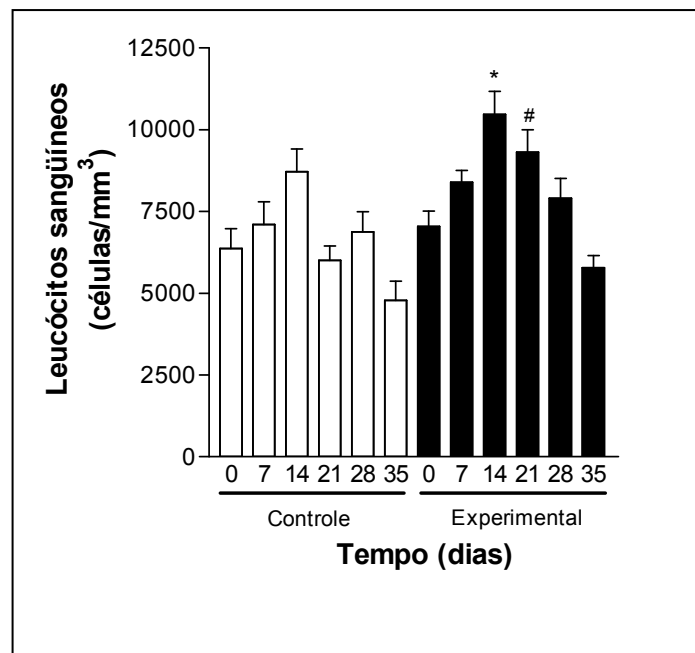


FIGURA 9 - Contagem total de leucócitos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste de ANOVA unidirecional e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foram aplicados em todos os resultados. *P < 0,05, significativamente diferente dos ratos tratados no dia 0; #P < 0,05, significativamente diferente dos ratos não-tratados no 21° dia.

As contagens diferenciais dos neutrófilos e células mononucleadas mostraram novamente que somente as últimas efetivamente contribuíram para segregar os resultados (FIGURAS 10 e 11). Embora diferindo na base temporal em relação ao primeiro experimento, o efeito proliferativo da fração PL sobre as células mononucleadas parece evidente em ambos os experimentos.

A fração PL de *C. procera*, administrada por *gavage* nos ratos, na dose 2.500 mg/kg de massa corpórea, foi incapaz de induzir toxicidade aguda nos animais experimentais. Portanto, a DL₅₀ (Dose Letal 50 %) não pôde ser determinada. Para a dose testada, nenhuma mudança comportamental nos animais foi observada, como alteração na atividade locomotora, movimentos estereotipados, tremores, convulsões, sedação, contorções abdominais, diarreia, coma e morte. Esse resultado corrobora com todos os outros previamente descritos aqui e contribui para a hipótese de ausência de toxicidade aguda na fração protéica testada.

4. Discussão

O látex é uma mistura complexa de moléculas circulantes livres e organelas celulares que juntas são chamadas lactíferas (YEANG *et al.*, 2002). Foi relatado que esse fluido possui atividades muito interessantes, embora a caracterização molecular de tais compostos ativos permaneça por ser realizada.

A avaliação tóxica do látex íntegro de *C. procera* em animais produz uma série de efeitos indesejáveis, facilmente detectáveis pela simples

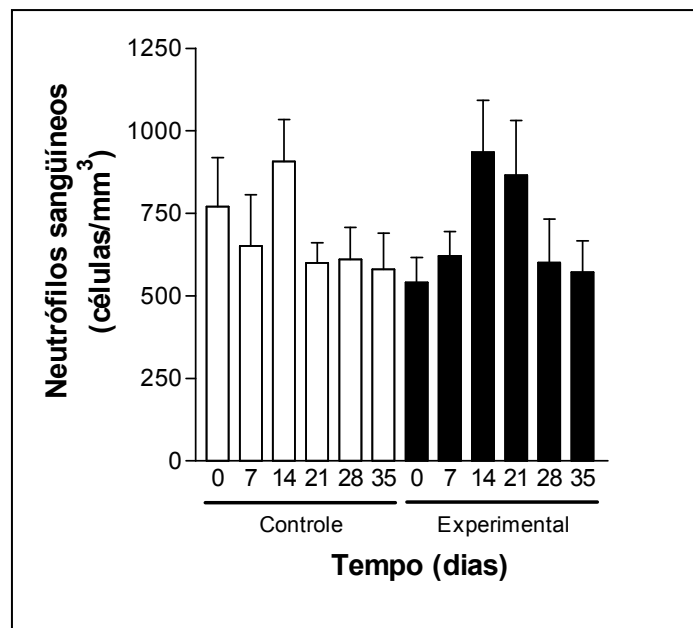


FIGURA 10 - Neutrófilos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste de ANOVA unidirecional e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foram aplicados em todos os resultados. Os valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

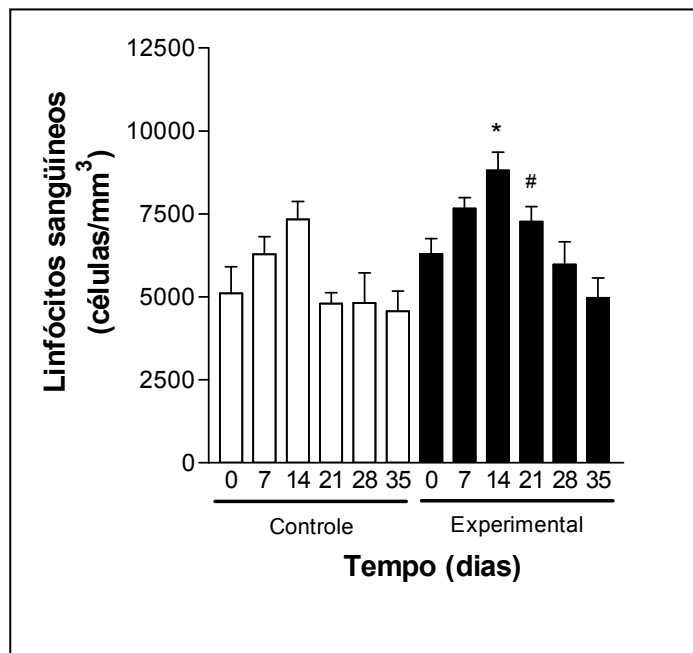


FIGURA 11 - Linfócitos sangüíneos de grupos de ratos não-tratados (□) e tratados com PL (■). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de sete animais. O teste de ANOVA unidirecional e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foram aplicados em todos os resultados. *P < 0,05, significativamente diferente dos ratos tratados no dia 0; #P < 0,05, significativamente diferente dos ratos não-tratados no 21° dia.

observação do comportamento e morte dos animais no período de 24 h (EL BADWI *et al.*, 1998). Pahwa e Chatterjee (1988) relataram efeitos desastrosos como: letargia, convulsões, colapso, hemorragia no fígado, aumento da secreção mucosa e migração de linfócitos e morte nos ratos alimentados durante 10 dias com látex de *C. procera*.

A ocorrência de intoxicação e envenenamento já foi documentada após o uso do látex de *C. procera* e outros materiais lactíferos, como descrito acima. A vasta composição molecular dos fluidos lactíferos impede a detecção direta dos compostos tóxicos. Mesmo sem a identificação das moléculas ativas envolvidas em tais eventos tóxicos, o fracionamento do látex íntegro pela solubilidade e massa molecular de seus constituintes significativamente contribui para caracterizar suas frações, assim como para apontar a direção a ser seguida na purificação dos princípios ativos.

Na tentativa de estudar os potenciais tóxicos e as propriedades farmacológicas, o látex íntegro de *C. procera* foi fracionado, sendo, então, essas características pesquisadas nas distintas frações obtidas. A fração protéica mais rica do látex foi alvo de análise devido à sua abundância, solubilidade aquosa e por ser destituída de borracha. Nessa fração, já foram descobertas atividades antinociceptiva e antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2005) que, grandemente, contribuíram para caracterizar e, posteriormente, identificar moléculas ativas que são agora consideradas como de natureza protéica. Conseqüentemente, seria de grande interesse, se pudesse ser provado que a mesma fração não está envolvida em efeitos deletérios causados pelo látex íntegro.

O desenho experimental realizado foi rigorosamente controlado e a coleta dos dados foi cuidadosamente registrada. A fração PL, incorporada à água de beber, administrada ao grupo experimental, não alterou qualquer um dos parâmetros fisiológicos investigados e a aparência dos ratos que consumiram a fração PL foi constantemente saudável ao longo do experimento.

Os ratos exibiram uma taxa de crescimento muito semelhante e não apresentaram diarreia ou perda de pêlos como pôde ser observado em experimentos nutricionais com animais alimentados com globulinas de feijão de corda (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em geral, os animais apresentavam-se saudáveis indicando que a presença de PL na água não causava qualquer detrimento nas características organolépticas ou efeitos prejudiciais pelo acesso contínuo à amostra.

Não houve ajuste da ingestão protéica no grupo controle, pelo fato de ambos os grupos de animais terem tido acesso livre contínuo à ração comercial que foi a fonte de nitrogênio. Com relação à ingestão da fração PL, essa não é imunologicamente detectada nas fezes o que sugere a absorção da mesma (RAMOS *et al.*, 2006a). Certamente a ingestão protéica não foi similar entre os grupos. Porém, o livre acesso à fração PL ao invés de somente à água potável, em adição à ração comercial não parece interferir no ganho de massa corpórea de animais experimentais que exibiram desempenho similar nos incrementos de ganho de massa ao longo do tempo comparado ao grupo controle. Deve ser enfatizado que o objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade.

Nenhum dos efeitos deletérios que ocorreram em cabras, como citado acima, nas quais o látex íntegro de *C. procera* foi administrado, ou seja, micção

freqüente, dispnéia e diarréia, foram detectados nos ratos, mesmo considerando a ingestão de doses correspondentes a 36 mg de PL por cada animal, o que corresponde a 206 mg/kg de massa corpórea. Cabras que receberam 1 ml/kg de massa corpórea de látex íntegro morreram, como relatado por El Badwi *et al.* (1998). De acordo com nossos dados de conteúdo protéico estimado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), 1 ml de látex íntegro de *C. procera* possui concentração protéica inferior a 10 mg/ml. Portanto, a dose protéica diária consumida pelos ratos foi muito maior do que as doses correspondentes administradas oralmente às cabras. A ausência de toxicidade detectável em ratos sugere que a maioria dos princípios tóxicos do látex de *C. procera* deve estar presente na fração não-protéica.

A ausência aparente de efeitos prejudiciais ou tóxicos no aspecto bioquímico, como resultado das análises séricas, foi notável. Quanto à análise bioquímica de glicose sangüínea, esse resultado difere levemente da crença popular de que o látex de *C. procera* teria alguma atividade hipoglicemiante. Na realidade todo este experimento foi inicialmente concebido no intuito de avaliar se a fração PL poderia causar tal efeito. A motivação surgiu depois do relato de populares de que a ingestão oral do látex produziria tal ação fisiológica. Entretanto foi possível verificar que se tal efeito ocorre não está associado à fração PL. É possível que o efeito hipoglicêmico do látex de *C. procera* possa estar presente em outra fração do látex não estudada.

Com relação às análises bioquímicas séricas, os resultados da investigação dos níveis lipídêmicos sugeriram que o consumo de PL não alterou o metabolismo dos lipídeos de animais ao final do período experimental

de 35 dias. Assim como também, os teores séricos, ao final do experimento, das proteínas totais, albumina e atividades enzimáticas da alanina amino transferase (ALT) e da aspartato amino transferase (AST), que são marcadores da função hepática, indicaram que a mesma foi preservada ao longo do tratamento. Do mesmo modo, os níveis de creatinina e uréia, que são provas da função renal, demonstraram que não houve toxicidade renal com 35 dias de ensaio.

Na avaliação da toxicidade aguda da fração PL, uma curva dose/resposta para o cálculo da dose letal seria pouco provável de ser alcançada, visto que a dose máxima considerada pelos protocolos internacionais para a avaliação de toxicidade de uma amostra é de 5.000 mg/kg de massa corpórea.

Os resultados encontrados nesta pesquisa não fornecem evidências do envolvimento dessa fração protéica em efeitos tóxicos que são relatados ocorrer quando o látex íntegro de *C. procera* é administrado (MAHMOUD, ADAM e TARTOUR, 1979; EL BADWI *et al.*, 1998).

Durante o presente estudo, o maior objetivo alcançado foi o estabelecimento de que através de um simples procedimento, desenvolvido por Bandeira (2006), é possível isolar atividades benéficas, tais como antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2004), antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005), larvicida (RAMOS *et al.*, 2006b), de propriedades tóxicas do látex.

Nessa pesquisa, a fração PL oferecida aos ratos não provocou efeitos tóxicos detectáveis. Portanto, a mesma ainda pode ser considerada como um

material promissor para a exploração de novas moléculas que apresentam atividades biológicas interessantes.

O perfil celular dos ratos controle e experimentais foi investigado, já que resultados recentemente publicados descreveram uma significativa atividade pró-inflamatória apresentada pelo látex de *C. procera* (KUMAR e SHIVKAR, 2004). Para isso, amostras sangüíneas e do fluido peritonial foram alvos de contagens total e diferencial de leucócitos com ênfase nas células mononucleadas e neutrófilos. Esses parâmetros foram determinados somente no 35° dia do primeiro experimento.

Recentemente, resultados de nosso grupo de trabalho, mostraram que a fração PL é capaz de inibir a inflamação peritonial induzida pela carragenina (ALENCAR *et al.*, 2004). Recentemente, Alencar *et al.* (2006) provaram que a reação inflamatória desenvolvida pelo látex de *C. procera* é mediada por uma outra fração do látex, rica em metabólitos de baixa massa molecular, denominada fração proteínas da diálise. Esse resultado sugere que um consumo oral e contínuo da fração PL não alterou o perfil celular na cavidade peritonial.

O efeito da fração PL sobre os leucócitos foi um dos resultados mais notáveis encontrado nesse estudo. Antes de qualquer abordagem sobre este dado, é fundamental relatar que há na literatura, a descrição de que animais que receberam doses do látex de *C. procera* responderam, dentre outros fatores, com o aumento do número de leucócitos no sangue, se comparados aos animais não tratados (DADA *et al.*, 2002). Ainda que a população de leucócitos tenha variado ao longo do tempo, a fração PL aumentou o nível de

células mononucleadas, mas não alterou o perfil de neutrófilos no sangue. Parece ser um mecanismo que, parcialmente, induz a proliferação de células mononucleadas que pode depender do consumo de PL. A ausência da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e a manutenção de seus níveis normais no sangue mostra uma ausência de resposta inflamatória aguda.

O pico de aumento das células mononucleadas no 14^o dia é comparável à resposta imune provocada pelas imunoglobulinas em animais quando desafiados com antígenos (MELO *et al.*, 1994). Não foi determinado se as mudanças no perfil das células mononucleadas estão relacionadas a uma resposta imunológica contra a fração PL.

O possível efeito mitogênico induzido pela fração PL de *C. procera* poderia estar relacionado à presença de proteínas ligantes a carboidratos, usualmente chamadas de lectinas. Muitas lectinas foram reportadas serem mitogênicas (BARRAL-NETO *et al.*, 1992). O látex de *H. brasiliensis* possui uma lectina denominada heveína, que se liga a quitina, quitobiose e quitotriose (ASENSIO *et al.*, 1995). As proteínas alergênicas do látex de *H. brasiliensis* possuem domínios *hevein-like* e muitas têm sido descritas como mitogênicas para as células mononucleadas sangüíneas periféricas (RAULF-HEIMSOTH *et al.*, 2004). Embora a presença de moléculas do tipo heveína não tenha sido comprovada no látex de *C. procera*, análises preliminares em nosso laboratório mostraram que a aplicação da fração PL de *C. procera* em coluna de quitina resulta numa fração protéica ligada a essa matriz. De acordo com os dados

atuais, não é possível correlacionar a proliferação de linfócitos a nenhum evento tóxico ou infeccioso em ratos experimentais.

Por outro lado, se a fração PL estimula a proliferação de células mononucleadas através da mitose, seria muito interessante pesquisar o potencial dessas proteínas na proteção de animais sob condições de imunossupressão.

Ainda duas considerações poderiam ser feitas. A primeira é que a hipótese de que os animais estariam sofrendo algum processo infeccioso é muito remota, visto que não houve processo inflamatório, e a segunda é que a mudança de perfil celular foi claramente observada só para linfócitos e nos animais do grupo experimental.

Em conclusão, a fração protéica mais abundante do látex de *C. procera*, separada de compostos de baixa massa molecular e destituída de borracha, não exibiu reações tóxicas detectáveis em animais experimentais que receberam amostras encerrando 2,5 mg de PL/ml, correspondendo a doses diárias de 206 mg/kg de massa corpórea continuamente por 35 dias. Porém, os resultados laboratoriais mostram que essa fração retém atividades antiinflamatória e antinociceptiva (ALENCAR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2005), além de seu efeito proliferativo parcial sobre as células mononucleadas, como descrito aqui. As proteínas do látex permanecem uma fonte interessante de moléculas biologicamente ativas que devem ser estudadas em detalhe quanto às suas propriedades estruturais, funcionais e aplicativas.

5. Referências bibliográficas

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

ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETCHELLS, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS M.V. Pro- and antiinflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, 2006. (Article in press).

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 228-232, 2005.

ASENSIO, J.L.; CANADA, F.J.; BRUIX, M.; RODRIGUEZ-ROMERO, A.; JIMENEZ-BARBERO, J. The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose. **Eur. J. Biochem.**, v. 230, p. 621-633, 1995.

BANDEIRA, G.P. **Caracterização bioquímica parcial do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento do mosquito transmissor da Dengue.** 2006. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol. Invest.**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITTO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Brasil: Editora da Unicamp, 1994. 122p.

DADA, Y.O.; LAMIDI, M.T.; EGHIANRUWA, K.I.; ADEPAJU, F. Effects of oral administration of the latex of *Calotropis procera* on weights, hematology and plasma biochemistry of rats. **Trop. Vet.**, v. 20, p. 218-225, 2002.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 307-311, 2000.

DUA, V.K.; OJHA, V.P.; ROY, R.; JOSHI, B.C.; VALECHA, N.; DEVI, C.H.; BHATNAGAR, M.C.; SHARMA, V.P.; SUBBARAO, S.K. Anti-malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 247-251, 2004.

DUBEY, V.K.; JAGANNADHAM, M.V. Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea and temperature. **Biochem.**, v. 42, p. 12287-12297, 2003.

EL BADWI, S.M.A.; ADAM, S.E.; SHIGIDI, M.T.; HAPKE, H.J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 105, p. 425-427, 1998.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 115-118, 2001.

KUMAR, V.L.; SHIVKAR, Y.M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators Inflamm.**, v. 13, p. 151-155, 2004.

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

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 95, p. 99-113, 1949.

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

MARKOUK, M.; BEKKOUICHE, K.; LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 293-297, 2000.

MELO, V.M.M.; XAVIER-FILHO, J.; LIMA, M.S.; PROUVOST-DANON, A. Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Food Agric. Immun.**, v. 6, p. 185-195, 1994.

OLIVEIRA, J.T.A.; PINTO, V.P.T.; VASCONCELOS, I.M.; FERNANDES, C.F.; RAMOS, M.V.; FERREIRA, F.V.A.; RIOS, F.J.B. *In vitro* and *in vivo* digestibility of the albumin and globulin fractions of eight Brazilian cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] cultivars. **J. Sci. Food Agric.**, v. 84, p. 1823-1830, 2004.

OSADEBE, P.O.; OKIDE, G.B.; AKABOGU, I.C. Study on anti-diabetic activities of crude methanolic extracts of *Loranthus micranthus* (Linn.) sourced from five different host trees. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 133-138, 2004.

PAHWA, R.; CHATTERJEE, V.C. The toxicity of Indian *Calotropis procera* R.Br. latex in the black rat, *Rattus rattus* Linn. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 30, p. 305-308, 1988.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; XAVIER, A.A.S.; LIMA, M.W.; BANDEIRA, G.P.; ETCHELLS, J.P.; NOGUEIRA, N.A.; ALENCAR, N.M.N. Latex proteins of *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 77, p. 251-256, 2006a.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 503-510, 2006b.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 261-266, 1999.

RAULF-HEIMSOTH, M.; ROZYNEK, P.; BRUNING, T.; RIHS, H.P. Characterization of B- and Tcell responses and HLA-DR4 binding motifs of the latex allergen Hev b 6.01 (prohevein) and its post-transcriptionally formed proteins Hev b 6.02 and Hev b 6.03. **Allergy**, v. 59, p. 724-733, 2004.

SCHMALKO, M.E.; ALZAMORA, S.M. Modelling the drying of a twig of "yerba maté" considering as a composite material: Part I: shrinkage, apparent density and equilibrium moisture content. **J. Food Eng.**, v. 66, p. 455-461, 2005.

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

SENNBLAD, B.; BREMER, B. Classification of apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. **Syst. Biol.**, v. 51, p. 389-409, 2002.

SING, B.; RASTOGI, R.P. Structure of asclepin and some observations on the NMR spectra of *Calotropis* glycosides. **Phytochemistry**, v. 11, p. 757-762, 1972.

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

SOUZA, C.A.M.; FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

SUSSMAN, G.L.; BEEZHOLD, D.H.; LISS, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods**, v. 27, p. 3-9, 2002.

TAHIR, F.; CHI, F.M. Phytochemical and antimicrobial screening of the leaf and root bark extracts of *Calotropis procera*. **Pakistan J. Scientific Ind. Res.**, v. 45, p. 337-340, 2002.

VOULDOUKIS, I.; LACAN, D.; KAMATE, C.; COSTE, P.; CALENDIA, A.; MAZIER, D.; CONTI, M.; DUGAS, B. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis melo* LC. extract rich in superoxide dismutase activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 67-75, 2004.

YEANG, H.Y.; ARIF, S.A.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v. 27, p. 32-45, 2002.

CAPÍTULO IV

ASPECTOS ALERGÊNICOS DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*

ÍNDICE	Página
1. Introdução.....	123
2. Materiais e métodos.....	127
2.1. Materiais.....	127
2.2. Equipamentos.....	127
2.3. Animais.....	128
2.4. Coleta e fracionamento do látex.....	128
2.5. Eletroforese das frações borracha do látex e proteínas do látex.....	129
2.6. Imunização por via subcutânea.....	130
2.7. Imunização por via oral.....	131
2.8. Obtenção de anti-soros.....	131
2.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgG e IgA.....	132
2.10. Anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	134
2.10.1. Anafilaxia cutânea passiva para IgG ₁	134
2.10.2. Anafilaxia cutânea passiva para IgE.....	135
2.11. Análise estatística.....	135
3. Resultados.....	136
4. Discussão.....	147
5. Referências bibliográficas.....	152

1. Introdução

A borracha natural oriunda do látex é amplamente usada na fabricação de utensílios médicos e de um número variado de artigos de utilidade industrial e doméstica. Desde seu primeiro relato clínico, a alergia ao látex, ou seja, a alergia do tipo 1 mediada pela IgE às proteínas do látex, tornou-se um importante problema médico e laborial, conhecido há cerca de 20 anos, dentre as pessoas que utilizam luvas de borracha e/ou estão expostas a outros produtos feitos da borracha natural oriunda do látex como preservativos, chupetas, sondas, bicos de mamadeira e balões de festa (NUTTER, 1979; FINK e KELLY, 1994; KURUP, MURALI e KELLY, 1995).

O látex da árvore da borracha (*Hevea brasiliensis*) é produzido por um grupo de células especializadas, chamadas lactíferos. O citosol dessas células contém partículas de borracha e um grande número de proteínas. Sob condições de dano, o conteúdo citoplasmático dessas células é expelido na forma de látex. As proteínas de defesa produzidas em resposta à injúria sofrida pela árvore na colheita da borracha são incorporadas ao látex e apresentam tendências de ligação à IgE, que podem resultar na reatividade alérgica (POSCH e CHEN-HEIMSOTH, 1977). Para a fabricação dos produtos feitos de borracha, o látex fresco é coletado em forte solução de amônia (20% da concentração final) para prevenir a coagulação. Compostos químicos como antioxidantes e antidegradantes são adicionados, seguidos pela vulcanização em temperatura alta. Apesar das condições inapropriadas, muitas proteínas permanecem na superfície dos produtos do látex, mesmo após as lavagens

para a remoção do excesso de compostos químicos e proteínas. Fortes reações alérgicas podem ser desencadeadas por essas proteínas/epítomos que permanecem na superfície dos produtos do látex (HAMANN, 1994). Foram reconhecidas pela União Internacional da Sociedade Imunológica (IUIS) 13 proteínas do látex de *H. brasiliensis* como sendo alergênicas (IUIS, 2006).

Respostas alérgicas imediatas do tipo I aos alérgenos do látex são agrupadas como desordem mediada pela imunoglobulina E, chamada de alergia ao látex (SPANNER *et al.*, 1989). Uma manifestação local é a urticária de contato no sítio de exposição às luvas de borracha (HAMANN, 1993).

As reações de hipersensibilidade ao látex ocorrem logo após a exposição ao alérgeno. Os anticorpos IgE específicos acoplados aos mastócitos interagem com os alérgenos, resultando na ativação dos mastócitos e liberação de vários mediadores farmacológicos (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Esses mediadores, tais como a histamina, leucotrienos e prostaglandinas podem ser responsáveis pela manifestação dos sintomas clínicos da alergia ao látex (BREITENEDER e SCHEINER, 1998).

A frequência das reações alérgicas ao látex tem sido parcialmente atribuída ao grande aumento no uso de luvas de borracha para a proteção contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hepatites B e C (BUBAK *et al.*, 1992; FINK e KELLY, 1994).

A borracha natural, ou seja, o *cis*-1,4-poliisopreno, que é um polímero isoprenóide sem função fisiológica conhecida no vegetal, é produzida em quantidades variadas por milhares de espécies de plantas lactíferas. O látex usado em aplicações comerciais, ou seja, a borracha natural comercial é

derivada, num percentual superior a 99 %, de uma única planta cultivada: a árvore da borracha, *H. brasiliensis*, uma planta originária do Brasil, mas que, atualmente, é cultivada principalmente no Sudeste da Ásia (BACKHAUS, 1985; SUBRAMANIAN, 1995; YEANG *et al.*, 2002).

O látex é freqüentemente reportado como possuidor de atividades biológicas e aplicações relevantes. Recentemente, a planta lactífera *Calotropis procera* recebeu atenção especial devido às distintas atividades importantes apresentadas pelo seu látex (ARYA e KUMAR, 2005; CHOEDON *et al.*, 2006).

A planta *C. procera* é um arbusto não-cultivado de distribuição geográfica pela Ásia, África e Nordeste da América do Sul. As propriedades medicinais da planta são bem documentadas nas regiões mais pobres da Índia, muitas delas sendo curativas (SHARMA e SHARMA, 1999).

De forma similar à *H. brasiliensis*, *C. procera* produz uma quantidade relevante de látex endógeno, que pode ser facilmente coletado a partir das folhas mais jovens quando danificadas. As propriedades farmacológicas do látex incluem atividades pró- e antiinflamatória, antinociceptiva, antipirética e antidiarréica, entre outras (MOSSA *et al.*, 1991; KUMAR *et al.*, 2001; LARHSINI *et al.*, 2002; ARYA e KUMAR, 2005; SEHGAL e KUMAR, 2005).

A planta parece estar completamente inserida na medicina popular da Índia, e no Brasil, a população mais pobre usa o látex íntegro principalmente para combater infecções de pele através da aplicação tópica. Rasik e colaboradores (1999) relataram que o látex de *C. procera* tem potencial cicatrizante em injúrias dérmicas em porquinhos-da-Índia.

Nosso grupo de trabalho estimou que a fração borracha do látex de *C. procera* compreende cerca de 84 %, enquanto as proteínas solúveis constituem 9 % da massa seca do látex. Resultados recentes de nossa pesquisa sugerem que a fração protéica solúvel separada da fração poliisoprenóide exhibe propriedades antiinflamatória e analgésica, sendo também destituída de ação inflamatória (ALENCAR *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2005).

Recentemente foi mostrado que a fração proteínas do látex é também potente na prevenção do desenvolvimento da larva de *Aedes aegypti*, o mosquito vetor da transmissão da dengue (RAMOS *et al.*, 2006b). As proteínas do látex também mostraram ser destituídas de toxicidade aguda e não foram detectadas nas fezes de ratos que receberam doses por via oral durante 35 dias (RAMOS *et al.*, 2006a). Apesar da relevância desse conjunto de resultados, não é sabido ainda se o látex de *C. procera* produz efeitos alergênicos e se o faz, qual poderia ser a contribuição das proteínas do látex em tal evento indesejável.

Portanto, seria relevante investigar as propriedades imunológicas e efeitos alergênicos dessa fração, já que o látex íntegro tem sido descrito como possuidor de forte atividade inflamatória por via oral (SHIVKAR e KUMAR, 2004), promotor de injúria celular endotelial permanente após contato com os olhos (AL-MEZAINE *et al.*, 2005), assim como de dermatite de contato alérgica (HANDA, SADANA e SHARMA, 1984).

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi fracionar o látex íntegro de *C. procera* em três frações distintas e avaliar a indução de resposta imune e

alergênica em camundongos quando essas frações foram administradas pelas vias subcutânea e oral.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Albumina sérica bovina (BSA) fração V, polioxietilenosorbitano monolaurato (Tween 20), imunoglobulina policlonal de coelho anti-IgG de camundongo conjugada à enzima fosfatase alcalina, imunoglobulina policlonal de cabra anti-IgA de camundongo conjugada à enzima fosfatase alcalina, tabletes do substrato *p*-nitrofenil fosfato dissódico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. Placas de microtitulação para ELISA (U96-Polysorp Surface-Nunc-Immuno Plate) foram obtidas da Nunc Brand Products, Nalge Nunc International, Denmark. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Equipamentos

Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206, Fanem. Sacos de diálise de membranas de celulose, MC 30x500 CLR Prism. Liofilizador L4KR, EDWARDS Alto Vácuo, BOC do Brasil Ltda. Eppendorf Centrifuge 5415R. Banho-Maria Y-28, Grant Instruments Cambridge Ltd. Leitor de ELISA, ELX 800, Bio-Tek Instruments, Inc.

2.3. Animais

As imunizações pelas vias subcutânea e oral foram desenvolvidas usando-se camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos, com 2 meses de idade, e 30 g de massa corpórea, em média. Os experimentos de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foram realizados em camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos, com 6 meses de idade, e 40 g de massa corpórea, em média, nos testes para IgG₁ e em ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, machos, com 6 meses de idade, e 400 g de massa corpórea, em média, nos testes para IgE.

Os animais, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A manutenção e o manuseio dos animais foram realizados nas mesmas condições já descritas anteriormente (item 2.3 – CAPÍTULO II).

2.4. Coleta e fracionamento do látex

O látex foi coletado como descrito anteriormente (item 2.4 – CAPÍTULO II). As amostras foram inicialmente submetidas à centrifugação a 6.000 x g, por 10 min, a 25 °C. A borracha precipitada foi separada do sobrenadante, que foi submetido à diálise contra água destilada (1:1), por 1 h, a 25 °C, usando-se uma membrana de diálise com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. Durante esta primeira hora de diálise, o

volume da água correspondeu exatamente ao volume do material do látex, (1:1). Essa água da diálise foi denominada proteínas da diálise (PD). Após 60 h de diálise (1:10), nas mesmas condições anteriores, o material retido pela membrana foi novamente centrifugado como descrito acima e o novo sobrenadante rico em proteínas solúveis, límpido e completamente livre de borracha (totalmente precipitada por insolubilidade em água) foi denominado proteínas do látex (PL). O restante da borracha foi unido àquela da primeira centrifugação e denominado borracha do látex (BL). As três frações do látex foram em seguida liofilizadas e usadas nas determinações posteriores.

2.5. Eletroforese das frações borracha do látex e proteínas do látex

Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras foi realizada com as frações BL extraída com diferentes soluções e PL. Os experimentos envolvendo eletroforese foram todos efetuados seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), como citado anteriormente (item 2.7 – CAPÍTULO II) com as seguintes diferenças.

Amostras de 10 mg de BL foram primeiramente extraídas com 1 ml de diferentes soluções (NaCl 1 M, NaOH 1 N e HCl 1 N) por 1 h, e centrifugadas a 10.000 x g, por 10 min, a 10 °C. Os materiais solúveis foram submetidos à diálise contra água destilada (1:10), por 60 h, a 25 °C, usando-se uma membrana de diálise com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da e liofilização antes da análise.

Amostras de 10 mg de tais materiais e de PL foram dissolvidas em 1 ml do tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 2 % de SDS e 5 % de β -mercaptoetanol). O material insolúvel foi removido por leve centrifugação, e o material solúvel foi preparado para a corrida eletroforética como descrito anteriormente (item 2.7 – CAPÍTULO II).

Amostras de 15 μ l foram aplicadas no interior do gel de aplicação, correspondendo a 150 μ g das frações BL e PL em cada poço do gel.

2.6. Imunização por via subcutânea

Quatro grupos experimentais de camundongos Swiss (com 15 animais cada) foram constituídos, sendo assim caracterizados: grupo I (controle) recebeu somente 1 mg hidróxido de alumínio (adjuvante)/0,5 ml solução salina/animal; grupo II recebeu PL (100 μ g dissolvidas em 0,5 ml de solução salina com 1 mg de hidróxido de alumínio/animal); grupo III recebeu PD (100 μ g dissolvidas em 0,5 ml de solução salina com 1 mg de hidróxido de alumínio/animal); grupo IV recebeu BL (100 μ g dissolvidas em 0,5 ml de solução salina com 1 mg de hidróxido de alumínio/animal). Os camundongos foram imunizados por via subcutânea e receberam reforços com 21 e 35 dias após o início da imunização de acordo com Melo *et al.* (1994).

2.7. Imunização por via oral

Quatro grupos experimentais de camundongos Swiss (com 15 animais cada) foram constituídos, sendo assim caracterizados: grupo I (controle) recebeu somente solução salina (0,5 ml/animal, p.o.); grupo II recebeu PL (5 mg/kg de massa corpórea em 0,5 ml de solução salina/animal, p.o.); grupo III recebeu PD (5 mg/kg de massa corpórea em 0,5 ml de solução salina/animal, p.o.); grupo IV recebeu BL (5 mg/kg de massa corpórea em 0,5 ml de solução salina/animal, p.o.). Os camundongos foram imunizados por via oral com o auxílio de uma sonda (*gavage*), durante 10 dias consecutivos, e receberam reforços com 21 e 35 dias após o início da imunização similar ao procedimento descrito por Florindo *et al.* (2002).

2.8. Obtenção de anti-soros

As amostras sangüíneas foram coletadas via plexo retro-orbital, sob leve anestesia por hidrato de cloral a 10 % em solução salina (25 µl/10 g de massa corpórea; i.p.), no início do experimento (dia 0) e com 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a imunização inicial. O *pool* de sangue foi deixado em banho-maria, a 37 °C, por 30 min, para retração do coágulo. Posteriormente, os soros foram separados do coágulo e centrifugados a 6.000 x *g*, por 10 min, a 25 °C, para separação das hemácias, e armazenados a -20 °C.

2.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgG e IgA

A resposta imune sistêmica induzida pelas frações do látex foi avaliada pelo ensaio imunoenzimático de acordo com o método descrito por Ramos *et al.* (1996). Os anticorpos obtidos pelas diferentes imunizações foram submetidos a testes de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), através da técnica de imunoadsorção indireta.

Para esses ensaios, as placas de microtitulação com 96 poços para ELISA (U96-Polysorp Surface-Nunc-Immuno Plate) foram sensibilizadas em cada poço com 150 µl das seguintes frações do látex, dissolvidas no tampão do antígeno (Na_2CO_3 0,1 M e NaHCO_3 0,1 M, pH 9,6): PL (em concentrações variando de 0,195 - 1.600 µg/ml); PD e BL (em concentrações variando de 7,8 - 500 µg/ml). O material foi incubado *overnight* a 4 °C.

Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes, com intervalos de 5 min, com o tampão de lavagem, ou seja, tampão PBS (NaCl 0,15 M, KH_2PO_4 0,003 M e K_2HPO_4 0,007 M, pH 7,4, Tween 20 0,05 %), secadas e bloqueadas por 1 h, a 37 °C, com 200 µl/poço da solução de BSA (BSA 9 mg/ml em tampão PBS, pH 7,4). Feito isso, uma segunda lavagem foi realizada conforme já descrito.

Depois, 150 µl/poço dos anti-soros, anti-PL, anti-PD e anti-BL, obtidos nos dias 0 e 42, através da imunização pelas vias subcutânea e oral, dissolvidos no tampão do anticorpo (KH_2PO_4 0,001 M, Na_2HPO_4 0,01 M, KCl 0,002 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6, Tween 20 0,025 %), na diluição 1:10.000, foram

adicionados e deixados em repouso por 2 h, a 37 °C. Em seguida, uma terceira lavagem foi feita segundo o procedimento já discriminado.

Após isso, 150 µl/poço do anticorpo secundário conjugado com a enzima (imunoglobulina policlonal de coelho anti-IgG de camundongo conjugada à enzima fosfatase alcalina ou imunoglobulina policlonal de cabra anti-IgA de camundongo conjugada à enzima fosfatase alcalina), dissolvido no tampão do anticorpo (KH_2PO_4 0,001 M, Na_2HPO_4 0,01 M, KCl 0,002 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6, Tween 20 0,025 %), na diluição fixa de 1:2.000, foram adicionados e deixados em repouso por 2 h, a 37 °C. Feito isso, uma quarta lavagem foi realizada conforme já descrito.

Em seguida, 150 µl/poço do tampão do substrato (Na_2CO_3 0,05 M, NaHCO_3 0,05 M e MgCl_2 0,01 M, pH 9,8) na concentração de 1 mg/ml do substrato p-nitrofenil fosfato dissódico foi adicionado e deixado em repouso por 30 min, a 37 °C. A reação foi então paralisada com a adição de 50 µl/poço da solução de hidróxido de sódio (NaOH 4 N) e a leitura foi feita a 492 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m. de 3 repetições das absorvâncias obtidas para os anti-soros em diferentes diluições.

Um ensaio adicional, envolvendo a cinética da síntese de IgG em camundongos, que foram imunizados pela via subcutânea com PL, foi realizado, utilizando-se os anti-soros dos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42.

2.10. Anafilaxia cutânea passiva (PCA)

A quantificação de anticorpos das classes IgG₁ e IgE, normalmente implicados na resposta alérgica, foi feita por reações de anafilaxia cutânea passiva como é descrito para a IgG₁ por Ovary (1958) e para a IgE por Mota e Wong (1969). O título de PCA foi definido como logaritmo na base 2 do inverso da diluição máxima do anti-soro ($D_{máx}$) capaz de provocar uma reação cutânea positiva (Título de PCA = $\text{Log}_2 1/D_{máx}$). Cada teste para IgG₁ foi feito em 2 camundongos e cada teste para IgE foi realizado em 2 ratos. Foram feitos 3 experimentos para cada teste, totalizando 6 repetições para cada imunoglobulina testada. Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m. de 6 repetições. Em cada teste de PCA foram utilizados como controlos soros de camundongos não imunizados e soros de títulos conhecidos.

2.10.1. Anafilaxia cutânea passiva para IgG₁

As determinações dos títulos de anticorpos do tipo IgG₁ foram feitas conforme citado por Melo *et al.* (1994) em camundongos Swiss. A pele da região dos animais foi tricotomizada, sob leve anestesia com éter, e as diluições dos anti-soros (anti-soro contra PL, anti-soro contra PD, anti-soro contra BL, todos relativos aos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42), em volume de 50 μ l, foram injetadas por via intra-dérmica em pontos previamente marcados no dorso dos animais. Após um período de latência de 2 h, foram injetados por via endovenosa, no plexo retro orbital, 250 μ l de solução salina de Azul de Evans

0,5 % contendo 250 µg do antígeno específico: PL, PD ou BL. Após 30 min, os ratos foram sacrificados com halotano e a pele foi dissecada para a leitura da reação feita através da visualização de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos anti-soros (FLORINDO *et al.*, 2002).

2.10.2. Anafilaxia cutânea passiva para IgE

As determinações dos títulos de anticorpos do tipo IgE foram feitas conforme citado por Melo *et al.* (1994) em ratos Wistar. A pele da região dos animais foi tricotomizada, sob leve anestesia com éter, e as diluições dos anti-soros (anti-soro contra PL, anti-soro contra PD, anti-soro contra BL, todos relativos aos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42), em volume de 100 µl, foram injetadas intradermicamente em pontos previamente marcados no dorso dos animais. Após um período de latência de 18 h, foi injetado, por via endovenosa, na veia peniana do animal, 1 ml de solução salina de Azul de Evans 0,5 % contendo 2 mg do antígeno específico: PL, PD e BL. A leitura da reação foi feita como descrito no item anterior.

2.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando-se o teste *t* de Student não-pareado nos resultados de ELISA. A análise de variância bidirecional (ANOVA) foi utilizada nos resultados dos títulos de IgE de anti-soros de camundongos

que receberam amostras por via subcutânea. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey.

Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do GraphPad Prism Software versão 4.0 (San Diego, CA).

3. Resultados

O látex íntegro da planta lactífera *C. procera* foi fracionado por etapas seqüenciais de centrifugação e diálise em três frações assim denominadas, proteínas do látex (PL), proteínas da diálise (PD) e borracha do látex (BL), as quais foram utilizadas para a indução da síntese de anticorpos específicos, através de imunizações pelas vias oral e subcutânea em camundongos.

A fração mais rica em proteína denominada PL foi caracterizada em trabalhos anteriores e exibe uma grande diversidade de proteínas (ALENCAR *et al.*, 2004). A fração PD, pobre em material protéico, tem mostrado conter compostos implicados na atividade pró-inflamatória previamente detectada no látex íntegro (ALENCAR *et al.*, 2006b).

A fração BL representa a borracha do látex que precipita em meio aquoso. Essa fração, assim como produtos de sua extração com soluções ácida, básica e de força iônica, foram analisados por eletroforese como mostrado na FIGURA 1. Como observado, a fração BL possui muitas proteínas. E o perfil dessas proteínas corresponde exatamente ao das proteínas do látex,

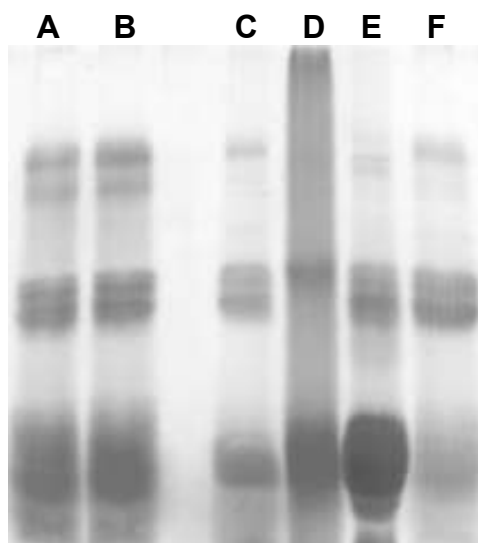


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % na presença de SDS e β -mercaptoetanol das frações BL e PL. A e B - fração PL (150 μ g); C - fração BL extraída com NaCl 1 M (150 μ g); D - fração BL extraída com NaOH 1 N (150 μ g); E - fração BL extraída com HCl 1 N (150 μ g); F - fração BL extraída com água destilada (150 μ g). Gel corado com azul brilhante de Coomassie R-350 a 0,1 %.

não importando a forma como as mesmas tenham sido extraídas. Portanto, esperado que as proteínas ainda encontradas na fração BL, altamente insolúvel em água, devam representar proteínas solúveis naturalmente presentes na fração PL. Provavelmente, essas proteínas co-precipitam com a borracha, resultante de seu aprisionamento durante o fenômeno semelhante à coagulação envolvendo cadeias de poliisopreno, que se inicia imediatamente após a coleta do látex.

Uma forte associação das proteínas do látex de *C. procera* com a borracha pode se assemelhar com aquela observada em produtos manufaturados do látex de *H. brasiliensis* que, ainda, retêm pequenas quantidades de proteínas mesmo após os procedimentos químicos aplicados para o processamento da borracha. Essas proteínas residuais mostraram-se envolvidas com a alergia aos produtos derivados do látex de *H. brasiliensis*. Dessa forma, a fração BL de *C. procera* foi investigada para se determinar seu envolvimento na indução ou não de alergia ao látex de *C. procera*.

A resposta imune sistêmica em camundongos às três frações estudadas do látex de *C. procera*, administradas pelas vias de imunização subcutânea e oral, foi detectada pela quantificação da produção de anticorpos das classes IgG e IgA, sendo estes estimados por ELISA. Enquanto que as respostas imunes do tipo IgG₁ e IgE foram avaliadas por reações de anafilaxia cutânea passiva em camundongos e ratos, respectivamente.

Injeções subcutâneas de PL nos dias 0, 21 e 35 induziram um perfil típico de síntese de IgG como mostrado na FIGURA 2. A produção do

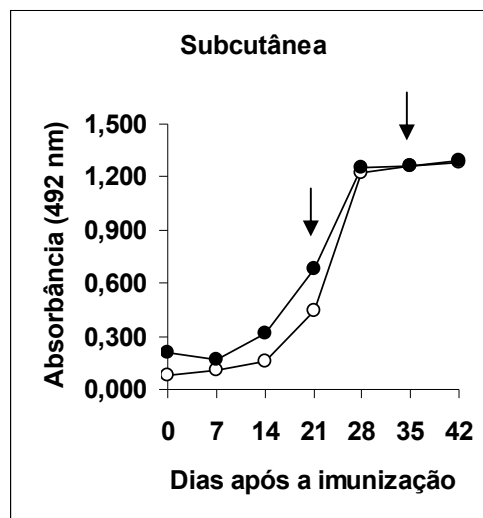


FIGURA 2 - Cinética da resposta do anticorpo (IgG) sérico específico para o látex de *C. procera* após a imunização por via subcutânea dos camundongos com PL detectada por ELISA. Duas diferentes concentrações do antígeno PL foram utilizadas: 8 µg/ml (○) e 500 µg/ml (●). As setas indicam os dias das injeções de reforço. Cada ponto representa a média \pm e.p.m. de três repetições. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. Os valores diferiram estatisticamente ao longo do tempo ($P < 0,05$).

anticorpo IgG específico para a fração PL foi monitorada nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 posteriores ao início da imunização. A produção desses anticorpos específicos foi aumentando ao longo do tempo (FIGURA 2) até o 28º dia, nas duas concentrações avaliadas, 8 µg/ml e 500 µg/ml, quando então ocorreu sua estabilização que se manteve em níveis elevados até o 42º dia. A fração PD foi completamente ineficiente enquanto a fração BL exibiu um perfil de síntese de IgG comparável àquele da fração PL (FIGURA 3).

Um incremento na síntese de IgA foi observado no anti-soro de animais que receberam a fração PL, mas não foi detectado no anti-soro de animais sensibilizados com as frações PD e BL (FIGURA 4). Deve ser ressaltado que nos ensaios de ELISA foram utilizadas concentrações de antígenos dentro de valores que comumente levam à detecção de respostas positivas, assim como também concentrações consideradas extremamente elevadas para melhor caracterizar uma possível resposta.

As frações do látex de *C. procer*a foram também desafiadas a induzir estímulo imunológico em camundongos pela sensibilização por via oral. Somente um discreto acréscimo do nível de IgG foi perceptível no anti-soro contra PL e BL enquanto a fração PD não alterou o perfil da IgG (dados não mostrados).

Aparentemente, a síntese de IgA não foi estimulada por nenhuma das frações quando os animais foram sensibilizados pela via oral (dados não mostrados). Deve ser mencionado que no protocolo usado para a sensibilização oral, os animais receberam antígenos diariamente até o 10º dia

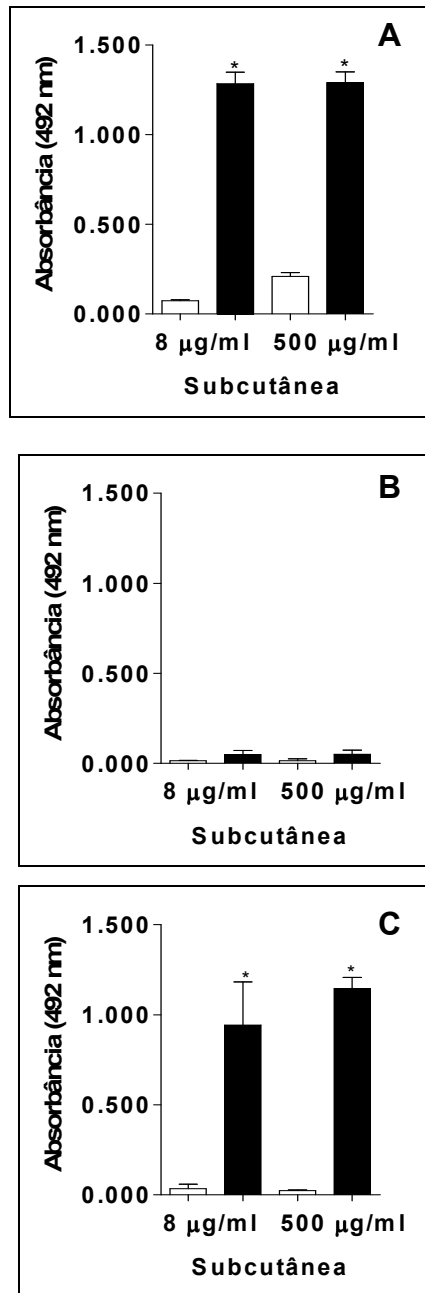


FIGURA 3 - Resposta do anticorpo (IgG) sérico específico para o látex de *C. procera* com 0 (○) e 42 (●) dias após a imunização por via subcutânea dos camundongos com: A) PL; B) PD; e C) BL detectada por ELISA. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de três repetições. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. * $P < 0,05$, significativamente diferente do dia 0.

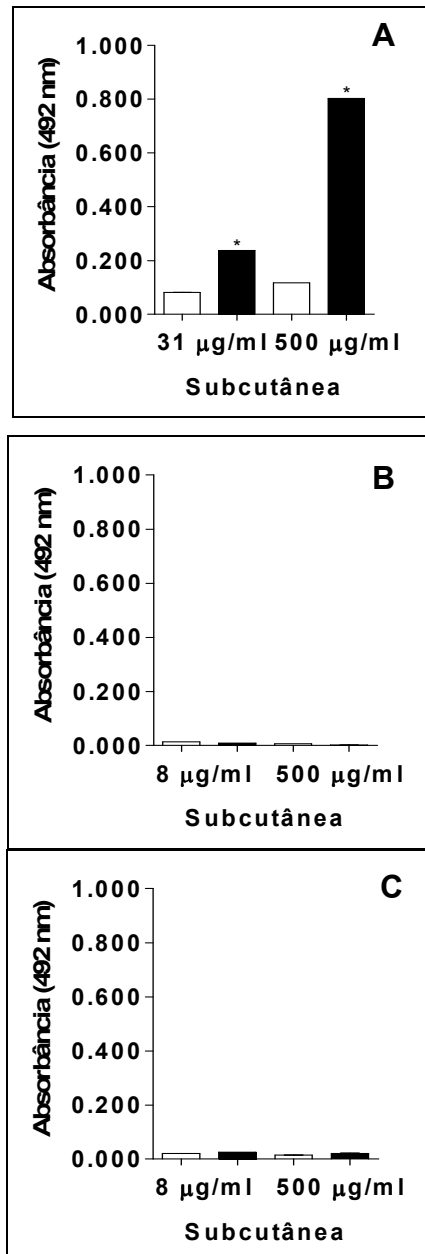


FIGURA 4 - Resposta do anticorpo (IgA) sérico específico para o látex de *C. procera* com 0 (○) e 42 (●) dias após a imunização por via subcutânea dos camundongos com: A) PL; B) PD; e C) BL detectada por ELISA. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de três repetições. O teste *t* de Student não-pareado foi aplicado em todos os resultados. * $P < 0,05$, significativamente diferente do dia 0.

e doses adicionais nos dias 21 e 35. Doses de 10 mg/kg de massa corpórea da fração BL provocaram morte dos animais antes das 24 h após a administração.

Os possíveis efeitos alergênicos induzidos pelas três frações do látex foram investigados por PCA em camundongos e ratos para estimar a síntese de IgG₁ e IgE, respectivamente. Os constituintes do látex não foram capazes de induzir a síntese de IgG₁ por nenhuma das duas vias utilizadas (FIGURA 5). Porém, como mostrado na FIGURA 6, a síntese de IgE foi estimada ocorrer em animais que receberam as frações PL e BL pelo estímulo subcutâneo.

A FIGURA 6 ilustra a ocorrência de reações de anafilaxia cutânea passiva, determinada através de manchas azuladas na pele do dorso dos animais, provocadas pelo extravasamento do corante ligado a proteínas plasmáticas. Isso é resultante do aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos induzido pelos mediadores químicos, como a histamina, liberados na degranulação dos mastócitos após a reação entre os antígenos endovenosos e os anticorpos localizados nos locais das aplicações dos anti-soros em estudo.

Tal resposta não foi detectada no anti-soro de animais que receberam as mesmas amostras pela via oral, sugerindo que os constituintes do látex podem induzir uma tolerância sistêmica em animais que recebem doses contínuas de antígenos pela via oral. Como julgado a partir da produção de IgE, a capacidade alergênica da fração PL não é proeminente quando a estimulação é feita pela via oral. A sensibilização subcutânea, porém pareceu induzir uma síntese de IgE mais intensiva na fração PL e numa menor extensão na fração BL (FIGURA 7). A análise estatística dos dados mostrou que as respostas do

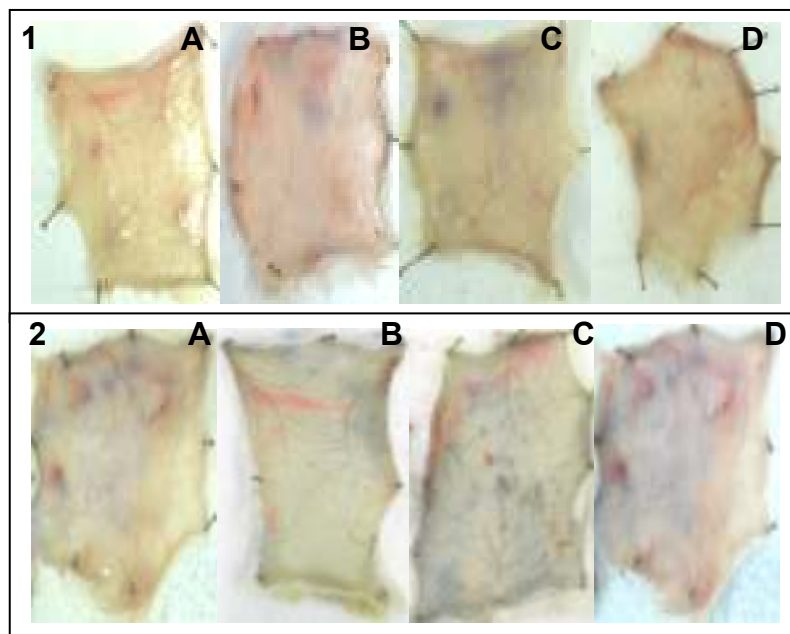


FIGURA 5 - Resposta do anticorpo IgG₁ sérico específico para o látex de *C. procerus* após as imunizações pelas vias oral (1) e subcutânea (2) dos camundongos detectada por PCA. A, Soro obtido dos camundongos pré-imunes. B, Anti-soro obtido dos camundongos imunizados com PL. C, Anti-soro obtido dos camundongos imunizados com PD. D, Anti-soro obtido dos camundongos imunizados com BL. As reações de PCA foram desencadeadas com 250 µg de cada uma das respectivas frações do látex em 250 µl de salina contendo Azul de Evans a 0,5 %.

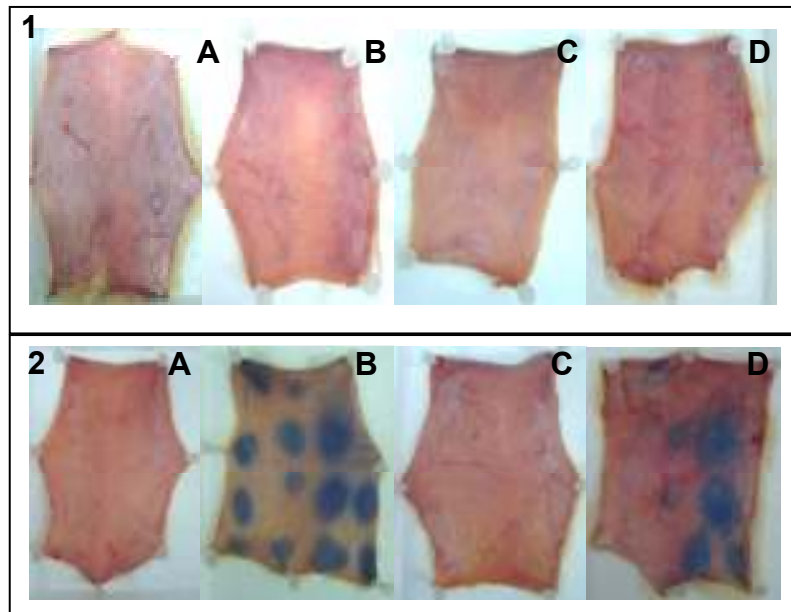


FIGURA 6 - Resposta do anticorpo IgE sérico específico para o látex de *C. procerca* após as imunizações pelas vias oral (1) e subcutânea (2) dos camundongos detectada por PCA. A, Soro obtido dos camundongos pré-*imunes*. B, Anti-soro obtido dos camundongos imunizados com PL. C, Anti-soro obtido dos camundongos imunizados com PD. D, Anti-soro obtido dos camundongos imunizados com BL. As reações de PCA foram desencadeadas com 2 mg de cada uma das respectivas frações do látex em 1 ml de salina contendo Azul de Evans a 0,5 %.

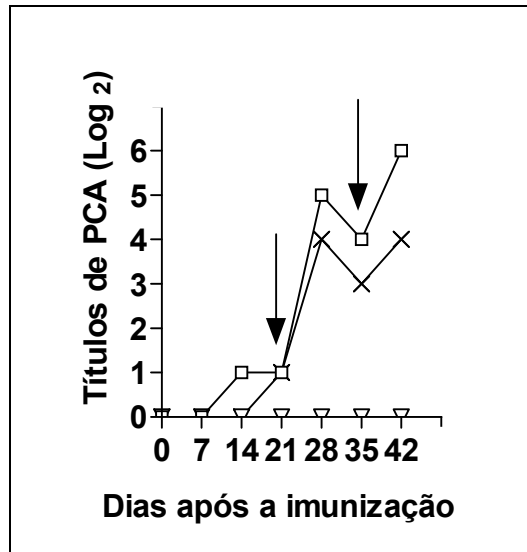


FIGURA 7 - Resposta imune IgE para frações de *C. procera*. Camundongos Swiss foram imunizados por via subcutânea com 100 μ g das frações: PL (□); PD (▽); e BL (X), misturadas com 1 mg de hidróxido de alumínio em solução salina por injeção. Reforços com cada fração estão indicados por setas. As reações de PCA para IgE foram desencadeadas em ratos com 2 mg da fração correspondente usada para as imunizações. Todos os valores referem-se aos *pools* de soros de 15 camundongos e cada ponto representa a média \pm e.p.m. de seis repetições. O teste de ANOVA bidirecional e o teste de Tukey foram aplicados em todos os resultados. As respostas do anticorpo IgE induzidas pelas frações PL e BL não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

anticorpo IgE induzidas pelas frações PL e BL não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$). Como discutido anteriormente, a fração BL possui proteínas semelhantes às daquelas da fração PL e, então, não são surpreendentes os resultados similares.

Respostas positivas crescentes foram observadas, sendo uma resposta imune primária 7 dias após a imunização inicial, uma resposta imune secundária 7 dias após a 1ª dose de reforço (aos 21 dias), quando então houve um leve declínio e uma resposta imune terciária 7 dias após a 2ª dose de reforço (aos 35 dias) (FIGURA 7). Como regra, a fração PL induz resposta imunológica, e animais que recebem amostras do látex por via subcutânea são muito mais sensibilizados a produzir IgE.

4. Discussão

Existe um interesse crescente na planta *C. procera*. A planta se tornou atraente pelas inúmeras atividades biológicas relevantes presentes em seus tecidos vegetais. É fácil obter-se o látex de *C. procera* onde a planta é encontrada devido à sua grande produção endógena. Não seria surpreendente se *C. procera* produzisse, proporcionalmente, mais látex que *H. brasiliensis*. Isso certamente contribui para a exploração do látex para propostas curativas.

Esforços foram feitos para fracionar o látex íntegro de *C. procera* com o objetivo de separar as atividades interessantes de propriedades indesejáveis. As frações PL, PD e BL foram obtidas após a execução de um protocolo simples baseado em centrifugação e diálise, e foram administradas, pelas vias

subcutânea e oral, em camundongos, para o estudo de suas propriedades imunológicas e efeitos alergênicos.

Respostas imunológicas mais expressivas foram verificadas em animais que foram sensibilizados pela via subcutânea. A fração PD foi incapaz de amplificar a síntese de anticorpos. Porém, já foi determinado que todo o potencial inflamatório do látex de *C. procera* está presente nessa fração (ALENCAR *et al.*, 2006b).

A fração PD é composta de sais e muitas outras substâncias de baixa massa molecular, algumas das quais já descritas (SEIBER, NELSON e LEE, 1982; SHIVKAR e KUMAR, 2003). Além disso, foi determinada a presença de peptídeos na fração PD, embora nenhuma caracterização bioquímica ou funcional adicional tenha sido feita. A concentração muito baixa de tais moléculas nessa fração pode, certamente, explicar a ausência de resposta imunológica detectável.

Por via subcutânea, a fração PL, assim como a fração BL, elicitaram a síntese de IgE que evidencia a presença de proteínas nessas frações capazes de induzir alergia. Na verdade, esses resultados dão maior suporte à discussão anterior sobre as proteínas presentes na fração BL serem as proteínas da fração PL, co-precipitadas com a borracha durante o fracionamento. Bandeira (2006) já havia descrito este processo em maior detalhamento.

Vale ressaltar que a fração PL constitui-se de uma fração protéica solúvel, apresentando muitas bandas protéicas distintas, com massas moleculares variando de 10.000 a 100.000 Da, estando as três principais bandas na faixa de 27.000. Essa fração é livre de poliisoprenóide e exhibe

propriedades antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2004) e antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005), sendo destituída de potencial inflamatório (ALENCAR *et al.*, 2006b). A fração BL apresenta uma pequena quantidade residual das mesmas proteínas que foram retidas por diálise na fração PL, ainda ligadas à borracha mesmo após os procedimentos de fracionamento. Portanto, foi relevante identificar esses aspectos alergênicos, pois essas proteínas presentes nas duas frações podem ser como no caso da *H. brasiliensis*, as responsáveis por reações alérgicas quando do seu contato. Além disso, os resultados sugeriram que tais proteínas alergênicas do látex de *C. procera* são em parte retidas pela borracha, assim como ocorre no látex da seringueira (POSCH e CHEN-HEIMSOTH, 1977).

Entretanto, o perfil detectado por PCA de indução da síntese de IgE por via subcutânea não foi repetido em animais que receberam as frações PL e BL por via oral, mesmo considerando que doses foram inicialmente administradas por 10 dias consecutivos. Esses achados fornecem evidências para uma tolerância sistêmica adquirida por camundongos que receberam a fração PL por via oral, pois tem sido sugerido que a resposta imune sistêmica pode estar relacionada à rota de imunização pela qual o antígeno é inicialmente administrado (OWEN, 1983).

Nesse trabalho foi verificado que pela imunização oral não foram detectadas respostas específicas de IgE, IgG₁, IgG e IgA para nenhuma das três frações testadas do látex de *C. procera*. Ao invés da resposta imune, uma tolerância sistêmica pode ter sido identificada, pois como já relatado por outros pesquisadores, antígenos administrados oralmente podem induzir a tolerância

efetiva suprimindo, por outro lado, a resposta imune subsequente a outros contatos imunogênicos com o antígeno (THOMAS e PARROT, 1974).

O capítulo sobre aspectos toxicológicos mostrou grupos de ratos que receberam doses de PL por via oral durante 35 dias consecutivos para a avaliação de efeitos subcrônicos. Surpreendentemente, o perfil de leucócitos foi alterado, sendo os linfócitos a se mostrarem aumentados (ALENCAR *et al.*, 2006a). Outro estudo prévio já havia citado uma observação semelhante, embora o látex íntegro tenha sido a amostra usada no ensaio, ao invés da fração mais rica em proteínas do látex (DADA *et al.*, 2002). Esses resultados e aqueles mostrados nas FIGURAS 3-A e 4-A sugerem que as proteínas do látex podem atuar como imunoestimulantes.

A capacidade de indução de resposta imune sistêmica por um determinado antígeno gera o interesse na aplicação do mesmo em via de imunização para a produção de vacinas e de anti-soros específicos, a serem utilizados em métodos de diagnóstico ou em experimentos para a compreensão dos mecanismos que regulam a imunidade sistêmica a antígenos administrados (DE CLERCQ *et al.*, 1990).

Em conclusão, a resposta imune sistêmica induzida por via subcutânea foi detectada pelo aumento da síntese de IgG, IgA e IgE contra a fração PL, e IgG e IgE contra a fração BL. A capacidade de indução subcutânea de resposta imune de IgG pelas frações PL e BL, e de IgA pela fração PL, as habilita como potenciais imunoestimulantes. A síntese de IgE detectada sugere a alergenicidade das frações PL e BL pela via subcutânea. O envolvimento da IgG₁ com a alergenicidade subcutânea foi nulo para as três frações. Por via

oral não houve detecção de IgG, IgA, IgE e IgG₁ para nenhuma das três frações do látex de *C. procera*, podendo uma tolerância sistêmica ter sido identificada. Finalmente, constituintes do látex de *C. procera* podem induzir consideráveis respostas imunológicas quando administrados por via subcutânea, mas aparentemente não causam forte estimulação por via oral, principalmente de caráter alergênico.

O presente estudo descreve efeitos imunológicos e alergênicos observados em camundongos induzidos pelas frações do látex de *C. procera*. Efeitos alergênicos puderam ser detectados nos anti-soros de camundongos que foram sensibilizados subcutaneamente enquanto tais efeitos não foram observados quando os animais foram tratados por via oral. Considerando que o látex também é usado como um agente tópico, permanece por ser investigado se esse contato poderia induzir efeitos indesejáveis. De relevância similar, reações cutâneas provocadas pela exposição ao látex devem ser investigadas tomando como amostra as frações do látex descritas aqui.

5. Referências bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2005. 562p.

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

ALENCAR, N.M.N.; AGUIAR, V.C.; LIMA, M.W.; XAVIER, A.A.S.; MESQUITA, R.O.; BANDEIRA, G.P.; VASCONCELOS, I.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; RAMOS, M.V. Toxicological evaluation of antiinflammatory and antinociceptive protein fraction from the latex of *Calotropis procera* and its proliferative effect upon lymphocytes. **Food Chem. Toxicol.**, 2006a. (Submetido).

ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETCHELLS, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS M.V. Pro- and antiinflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, 2006b. (Article in press).

AL-MEZAINE, H.; AL-RAJHI, A.A.; AL-ASSIRI, A.; WAGONER, M.D. *Calotropis procera* (Ushaar) Keratitis. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 391, n. 1, p. 199-202, 2005.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 228-232, 2005.

BACKHAUS, R.A. Rubber formation in plants: a mini review. **Isr. J. Bot.**, v. 34, p. 283-293, 1985.

BANDEIRA, G.P. **Caracterização bioquímica parcial do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento do mosquito transmissor da Dengue.** 2006. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BREITENEDER, H.; SCHEINER, O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 116, p. 83-92, 1998.

BUBAK, M.E.; REED, C.E.; FRANSWAY, A.F.; YUNGINGER, J.W.; JONES, R.T.; CARLSON, C.A.; HUNT, L.W. Allergic reactions to latex among health care workers. **Mayo Clin. Proc.**, v. 67, p. 1075-1079, 1992.

CHOEDON, T.; MATHAN, G.; ARYA S.; KUMAR V.L.; KUMAR V. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 2517-2522, 2006.

DADA, Y.O.; LAMIDI, M.T.; EGHIANRUWA, K.I.; ADEPAJU, F. Effects of oral administration of the latex of *Calotropis procera* on weights, hematology and plasma biochemistry of rats. **Trop. Vet.**, v. 20, p. 218-225, 2002.

DE CLERCQ, A.; VANDEWIELE, M.; VAN DAMME, J.; GUERCHE, P.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCHHOVO, J.; KREBBUS, E. Stable accumulation of modified 2S albumin and storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. **Plant Physiol.**, v. 94, p. 970-979, 1990.

FINK, J.N.; KELLY, K.J. Latex hypersensitivity: an emerging problem. **Allergy Clin. Immunol. News**, v. 6, p. 4-6, 1994.

FLORINDO, M.I.; ARAGÃO, M.E.F.; SILVA, A.C.M.; OTOCH, M.L.; FERNANDES DE MELO, D.; LIMA, J.A.A.; SILVA LIMA, M.G. Immune response induced in mice by oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 7, p. 827-835, 2002.

HAMANN, C.P. Natural rubber latex protein sensitivity in review. **Am. J. Contact Dermatitis**, v. 4, p. 4-21, 1993.

HAMANN, C.P. Latex hypersensitivity: an update. **Allergy Proc.**, v. 15, n. 1, p. 17-20, 1994.

HANDA, F.; SADANA, J.K.; SHARMA, P.K. Allergic contact dermatitis due to the plant *Calotropis procera* (Vern: AK). A case report. **Indian J. Dermatol.**, v. 29, p. 27-29, 1984.

IUIS. INTERNATIONAL UNION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETIES. Allergen Nomenclature. **List of allergens.** Disponível em: <<http://www.allergen.org/List.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 115-118, 2001.

KURUP, V.P.; MURALI, P.S.; KELLY, K.J. Latex antigens. In: FINK, J.N. **Immunology and allergy clinics of North America**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. p. 45-59.

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

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J.T.; BEKKOUICHE, K.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytotherapy Res.**, v. 16, p. 97-98, 2002.

MELO, V.M.M.; XAVIER-FILHO, J.; LIMA, M.S.; PROUVOST-DANON, A. Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Food Agric. Immun.**, v. 6, p. 185-195, 1994.

MOSSA, J.S.; TARIQ, M.; MOHSIN, A.; AGEEL, A.M.; AL-YAHYA, M.A.; AL-SAID, M.S.; RAFATULLAH, S. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. **Am. J. Chin. Med.**, v. 19, n. 3-4, p. 223-231, 1991.

MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci.**, v. 8, n. 16, p. 813-820, 1969.

NUTTER, A.F. Contact urticaria to rubber. **Br. J. Dermatol.**, v. 101, p. 597-598, 1979.

OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, v. 81, n. 4, p. 355-357, 1958.

OWEN, R.L. Ultrastructure of antigen trapping epithelia of mucosal lymphoid organs. In: OGRA, P.L.; JACOBS, D.M. **Regulation of the immune response**. Basel: Karger, 1983. p. 88-98.

POSCH, A.; CHEN-HEIMSOTH, M. Latex allergens: a review of current knowledge. **Pneumologie**, v. 51, p. 1058-1062, 1977.

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; ROUGÉ, P. Structural similarities among *Diocleae* lectins **Lectins: Biol. Biochem. Clin. Biochem.**, v. 11, p. 44-49, 1996.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; XAVIER, A.A.S.; LIMA, M.W.; BANDEIRA, G.P.; ETCHELLS, J.P.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon *in vitro* enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 77, p. 251-256, 2006a.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 503-510, 2006b.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 261-266, 1999.

SEHGAL, R.; KUMAR, V.L. *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia-effect of antiinflammatory drugs. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 216-220, 2005.

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

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. Evaluation of *in vitro* schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera* – an ethnobotanical approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 83-95, 1999.

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

SHIVKAR, Y.M.; KUMAR, V.L. Effect of antiinflammatory drugs on pleurisy induced by latex of *Calotropis procera* in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 335-340, 2004.

SOARES, P.M.; LIMA, S.R.; MATOS, S.G.; ANDRADE, M.M.; PATROCÍNIO, M.C.A.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V.; CRIDDLE, D.N.; CARDI, B.A.; CARVALHO, K.M.; ASSREUY, A.M.; VASCONCELOS, S.M.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 125-129, 2005.

SPANNER, D.; DOLOVICH, J.; TARLO, S.; SUSSMAN, G.; BUTTOO, K. Hypersensitivity to natural latex. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 83, p. 1135-1137, 1989.

SUBRAMANIAN, A. The chemistry of natural rubber latex. In: FINK, J.N. **Immunology and allergy clinics of North America**. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995. p. 1-20.

THOMAS, H.C.; PARROT, M.V. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. **Immunology**, v. 27, p. 631-640, 1974.

YEANG, H.Y.; ARIF, S.A.M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v. 27, p. 32-45, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

As proteínas do látex foram parcialmente susceptíveis à proteólise em ensaios *in vitro* e não foram detectadas imunologicamente em materiais fecais, sugerindo que as mesmas, ou foram digeridas e absorvidas, ou foram absorvidas íntegras, quando ingeridas em ensaios *in vivo*.

A fração PL, separada de compostos de baixa massa molecular e destituída de borracha, não produziu reações tóxicas subcrônicas ou agudas detectáveis em animais experimentais, portanto eventos tóxicos ou letalidade associados ao látex, como descritos na literatura, não estão relacionados com essa fração.

A fração proteínas do látex, que retém atividades antiinflamatória e analgésica, produziu efeito proliferativo parcial sobre as células mononucleadas, principalmente linfócitos, mas não alterou o perfil de neutrófilos no sangue, mostrando uma ausência de resposta inflamatória aguda, quando administrada pela via oral.

Efeitos alergênicos puderam ser detectados nos anti-soros de camundongos que foram sensibilizados por via subcutânea com as frações proteínas do látex e borracha do látex, enquanto tais efeitos não foram detectados quando os animais foram imunizados por via oral.

A fração BL apresenta uma quantidade residual das mesmas proteínas alergênicas da fração proteínas do látex, co-precipitadas com a borracha durante o fracionamento.

Evidências para uma possível tolerância sistêmica adquirida por camundongos que receberam as proteínas do látex de *C. procera* por via oral foram fornecidas, pois não houve produção dos anticorpos estudados, IgG, IgA, IgE e IgG₁.

A indução de síntese dos anticorpos IgG e IgA por via subcutânea, sugere que as proteínas do látex podem atuar como imunoestimulantes.

As proteínas do látex permanecem uma fonte interessante de moléculas biologicamente ativas que devem ser estudadas em detalhe quanto às suas propriedades estruturais, funcionais e aplicativas.