



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MAYCK SILVA BARBOSA**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTI- E PRÓ-INFLAMATÓRIA DO LÁTEX DE  
*Plumeria pudica* (JACQ., 1960)**

**PARNAÍBA**

**2019**

**MAYCK SILVA BARBOSA**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTI- E PRÓ-INFLAMATÓRIA DO LÁTEX DE  
*Plumeria pudica* (JACQ., 1960)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Química e Bioquímica aplicada à Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira

PARNAÍBA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

B238e Barbosa, Mayck Silva.

Estudo das atividades anti- e pró-inflamatória do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1960) [recurso eletrônico] / Mayck Silva Barbosa. – 2019.

1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

1. Biotecnologia. 2. *Plumeria pudica*. 3. Apocynaceae. 4. Fluidos laticíferos. 5. Inflamação. 6. Histamina I. Título.

CDD: 660.6

MAYCK SILVA BARBOSA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTI- E PRÓ-INFLAMATÓRIA DO LÁTEX DE**  
*Plumeria pudica* (JACQ., 1960)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 10 / 07 / 19

BANCA EXAMINADORA



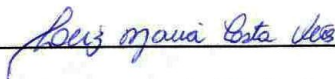
---

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira  
Universidade Federal do Piauí  
(Presidente)



---

Dr. Tarcísio Vieira de Brito  
Universidade Federal do Piauí  
(Membro externo)



---

Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras  
Universidade Federal do Piauí  
(Membro interno)

Dedico esse trabalho à minha família, especialmente, ao meu bisavô “Vô Roberto” (*In memoriam*), um exemplo de sabedoria.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, na pessoa de Jesus Cristo, pelo Amor, Bondade e Misericórdia, os quais pude presenciar ao longo da vida e do mestrado. A Ele sejam dadas a Honra e Glória!

A minha família, especialmente meu pai, **Raimundo**, e minha mãe, **Cícera** pela paciência e apoio incondicional em todas as decisões tomadas até aqui. Sem seus exemplos de amor e humildade, não teria sido possível continuar a jornada. A minha irmã, **Keyte**, pelo companheirismo e determinação que me fazem amadurecer a cada dia.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira**, primeiramente, por acreditar no meu potencial desde o início. Em seguida, por estar sempre presente e me proporcionar ensinamentos de Verdade, Paciência, Planejamento e Amor pela pesquisa científica, os quais levarei para vida.

À **Prof. Dra. Leiz Maria Costa Veras**, pela parceria desde a graduação na infinita saga com o óleo do Jaborandi. Agradeço pela paciência, ensinamentos e participação da banca examinadora, contribuindo enormemente para melhorar este trabalho.

Ao **Dr. Tarcísio Vieira de Brito**, pela disponibilidade e parceria na construção desse trabalho. Sem sua destreza e bom humor, não seria possível executá-lo e render bons frutos. E por ter aceitado participar da banca na fase final do mestrado.

Ao **Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa**, pela parceria e inteira disponibilidade em me ajudar neste trabalho, abrindo as portas do laboratório LAFEX para que os experimentos com animais pudessem ser realizados e por dar recomendações muito valiosas na construção do mesmo. Sou muito grato aos seus alunos, que se disponibilizaram e me ajudaram com muita paciência, mostrando-se muito prestativos na realização de tais ensaios.

Ao **Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus**, por ter aceitado participar da banca examinadora de qualificação e contribuir de forma muito valorosa com o trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa do **Laboratório de Bioquímica de Plantas Laticíferas**, tanto os mestrandos (**Bruna Souza, Ana Clara Sales, Lucas Arruda, Lucas Eduardo Oliveira, Felipe Cardoso**), como as alunas de Iniciação Científica (**Daiane Soares e Joana D'arc Lopes**), pelo companheirismo e ajuda mútua em

realizar esse trabalho. E também pelas altas risadas dentro do laboratório e no grupo de *WhatsApp* “Rolês Cromatográficos”.

Aos professores do **Programa de Pós-graduação em Biotecnologia** pela oportunidade de aprender e elevar meus conhecimentos científicos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI)** e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo suporte financeiro estudantil.

Aos técnicos administrativos da UFPI, pela disponibilidade e paciência em ajudar durante várias dificuldades, especialmente, **Juelina Santos, Beatriz Melo, Cézar, Paulinha e Selmira Ribeiro**.

Aos funcionários do Cemitério da Igualdade, lugar onde as coletas foram feitas, pelo cuidado das plantas e respeito.

Ao GEAMICOL, na pessoa da **Profa. Dra. Tatiane Caroline Daboit**, pelo carinho e abertura de portas do laboratório para que os primeiros ensaios com fungos pudessem ser realizados. Além disso, agradeço imensamente a todos seus alunos, **Gabi Mendes e Káritta Raquel Lustoza** (companheiras desde a graduação), **Andressa Carvalho, Renata Nolêto, Clarissy Medeiros, Maria Sarah Machado e Mateus Amaral**, pela amizade, aconselhamento, momentos de descontração e disponibilidade em me ensinar e ajudar nos experimentos.

Ao LAPHIS, pela colaboração na estrutura para manutenção dos animais.

Aos anjos do BIOTEC, **Leiz Veras, Alyne Araújo, Raí Emanuel, Mariana Araújo, Flaviane de França e João Marcos** que me ajudaram de várias maneiras, tirando dúvidas, aconselhando e disponibilizando-se a ajudar em alguns experimentos.

Aos outros companheiros do BIOMIC, **Manuela Barros, Naiany Carvalho, Juliana Lima, Silveny Vieira, Dacylla Sampaio, Vanessa Poleanna** pela parceria, amizades e risadas.

Às minhas amigas e vizinhas, **Fabiana Sátiro e Juelina Santos**, pela força, aconselhamento sem medidas e incentivo do início à concretização do mestrado.

À **Profa. Dra. Loredana Nilkenes Gomes da Costa** pelos seus minutos gastos para me ouvir e aconselhar, assim como, pelo exemplo de humildade e perseverança.

A todos os irmãos do **Caminho Neocatecumenato**, especialmente, **Carla e Klecius**, por me estimularem a não desistir do mestrado e da vida cristã, e aos irmãos da **Igreja Assembleia de Deus do Gama**, que me acolheram com muito amor.



*“Porque eu bem sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o Senhor; pensamentos de paz e não de mal, para vos dar o fim que esperais.” (Jeremias 29:11)*

## RESUMO

Os fluidos laticíferos têm sido explorados devido ao seu vasto potencial farmacológico, incluindo, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. Entretanto, são também descritos como detentores de moléculas pró-inflamatórias e com propriedades tóxicas. *Plumeria pudica* Jacq. é uma planta ornamental caracterizada pela intensa produção de látex. Estudos realizados com seu látex têm demonstrado que sua fração proteica (PLPp) apresenta ação anti-inflamatória em diferentes modelos animais. Por outro lado, o látex desta planta não foi investigado quanto a presença de moléculas com ação pró-inflamatória. Diante dos relatos de que as atividades anti- e pró-inflamatória podem coexistir em fluidos laticíferos, o objetivo desse estudo foi de investigar a presença destas atividades nas frações obtidas do látex de *P. pudica*. O látex foi coletado em água destilada (1:1; v/v) e submetido a fracionamento por meio de centrifugação e diálise contra água destilada utilizando membranas com porosidade de 8 kDa. Foram obtidas duas frações distintas, a fração Proteínas do Látex (PLPp), caracterizada pela presença de moléculas com massa molecular superior a 8 kDa e a fração Dialisado do Látex (DLPp), compreendendo moléculas com massa molecular inferior a 8 kDa. Para verificar a presença de atividade pró-inflamatória, diferentes concentrações das frações PLPp e DLPp (100, 300 e 500µg) solubilizadas em salina estéril (0,9%) foram administradas por via intraplantar em camundongos. A atividade anti-inflamatória de DLPp (10, 20 e 30 mg/kg) foi investigada no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Para avançar no estudo do mecanismo de ação pró-inflamatória de DLPp, animais foram pré-tratados com Cloridrato de Prometazina (PROM), um fármaco anti-histamínico, antes de receberem DLPp. Em paralelo, foi investigado se PLPp, detentora de atividade anti-inflamatória, poderia inibir a ação pró-inflamatória promovida por DLPp. Para complementar, as atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e superóxido dismutase (SOD) foram determinadas. O teor de proteínas solúveis em DLPp foi avaliado bem como o perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida (17,5%). Além disso, a presença de histamina em DLPp foi investigada por espectrofotometria. Como resultados observamos que somente a fração DLPp (300 µg/pata) induziu a formação do processo inflamatório, com pico ocorrendo nos primeiros 30 minutos. A inflamação induzida por DLPp foi inibida pelo anti-histamínico PROM e PLPp. Não houve alteração nas atividades de MPO e SOD, sugerindo o não envolvimento de células de defesa na indução da inflamação. Em relação à atividade anti-inflamatória, DLPp não inibiu significativamente a inflamação nas concentrações testadas. A composição de DLPp releva uma baixa concentração de proteínas solúveis com a presença de peptídeos e de histamina. Portanto, é possível concluir que o látex de *P. pudica* induz inflamação aguda e que as propriedades pró- e anti-inflamatória coexistem no látex da planta, podendo ser separadas por meio de etapas de centrifugação e diálise.

**Palavras-chave:** Apocynaceae, Fluidos laticíferos, Inflamação, Histamina

### **ABSTRACT**

Lactiferous fluids have been exploited due to its very large pharmacological potential, including, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor activity. However, they are also described to have proinflammatory and toxic molecules. *Plumeria pudica* Jacq. is an ornamental plant characterized by intense latex production. Studies with its latex have shown that its protein fraction (PLPp) has anti-inflammatory action in different animal models. On the other hand, the latex of this plant has not been investigated for the presence of molecules with proinflammatory action. Considering that anti-inflammatory and proinflammatory activities can coexist in laticiferous fluids, the objective of this study was to investigate the presence of these activities in the fractions obtained from *P. pudica* latex. The latex was collected in distilled water (1:1; v/v) and fractioned by centrifugation and dialysis against distilled water using membranes with 8 kDa porosity. Two distinct fractions were obtained, the Latex Proteins fraction (PLPp), characterized by the presence of molecules with molecular weight higher than 8 kDa and the Dialyzed Latex fraction (DLPp), comprising molecules with a molecular weight less than 8 kDa. In order to verify the presence of proinflammatory activity, different concentrations of PLPp and DLPp (100, 300 and 500µg) solubilized in sterile saline (0.9%) were administered intraplantarly in mice. The anti-inflammatory activity of DLPp (10, 20 and 30 mg/kg) was investigated in the carrageenan-induced paw edema model. Advancing the study of the proinflammatory action mechanism of DLPp, animals were pretreated with Promethazine Hydrochloride (PROM), an antihistamine drug, before receiving DLPp. Simultaneously, inhibition of DLPp-induced paw edema by PLPp, which possesses anti-inflammatory activity, was investigated. In addition, the activities of the myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) enzymes were determined. The content of soluble proteins in DLPp was evaluated as well as the protein profile by electrophoresis in polyacrylamide gel (17.5%). In addition, the presence of histamine in DLPp was investigated by spectrophotometry. As a result, we observed only the DLPp fraction (300 µg/pata) induced the formation of the inflammatory process, occurring the peak within the first 30 minutes. The DLPp-induced inflammation was inhibited by the antihistamine PROM and PLPp. There was no change in MPO and SOD activities, suggesting the non-involvement of defense cells in the induction of inflammation. Regarding anti-inflammatory activity, DLPp did not significantly inhibit inflammation at the concentrations tested. The composition of DLPp shows a low concentration of soluble proteins with the presence of peptides and histamine. In summary, *P. pudica* latex induces acute inflammation and the proinflammatory and anti-inflammatory properties coexist in the latex of this plant and they can be separated by centrifugation and dialysis steps.

**Keywords:** Apocynaceae, Lactiferous Fluids, Inflammation, Histamine

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Aspecto geral de <i>P. pudica</i> .....	20
<b>Figura 2.</b>	Origem molecular da histamina .....	26
<b>Figura 3.</b>	Recrutamento de leucócitos para o local da lesão.....	28
<b>Figura 4.</b>	Desenho experimental do estudo.....	30
<b>Figura 5.</b>	Processo de coleta e processamento do látex de <i>P. pudica</i> .....	31
<b>Figura 6.</b>	Efeito da indução de edema de pata pelas frações do látex de <i>P. pudica</i> .....	38
<b>Figura 7.</b>	Efeito da indução de edema de pata pela fração DLPp após 30 minutos.....	39
<b>Figura 8.</b>	Determinação da atividade de mieloperoxidase no efeito pró-inflamatório de DLPp e PLPp.....	40
<b>Figura 9.</b>	Efeito anti-inflamatório da fração DLPp no edema de pata induzido por carragenina.....	41
<b>Figura 10.</b>	Efeito anti-inflamatório da fração DLPp no edema de pata induzido por carragenina na 3 <sup>a</sup> hora de tratamento.....	42
<b>Figura 11.</b>	Inibição do efeito pró-inflamatório de DLPp por moléculas anti-inflamatórias avaliado em 30 min.....	43
<b>Figura 12.</b>	Determinação da atividade de superóxido dismutase no efeito pró-inflamatório de DLPp avaliado em 30 minutos.....	43
<b>Figura 13.</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (17,5%) da fração dialisável do látex de <i>P. pudica</i> (DLPp).....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Concentração de proteínas totais da fração dialisável do látex de <i>P. pudica</i> (DLPp).....	44
<b>Tabela 2.</b>	Concentração de histamina da fração dialisável do látex de <i>P. pudica</i> (DLPp).....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA:** Análise de variância
- COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- Da:** Dalton
- DLPp:** Fração dialisável do látex de *Plumeria pudica*
- E.P.M.:** Erro padrão da média
- HTAB:** Brometo de haxadeciltrimetilamônio
- i.p.:** Intraperitoneal
- kDa:** Kilodalton
- MPO:** Mieloperoxidase
- PLPp:** Proteínas do látex de *Plumeria pudica*
- SDS:** Sulfato dodecil de sódio
- SOD:** Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
2.1 Látex .....	18
2.2 <i>Plumeria pudica</i> .....	19
2.2.1 Características gerais .....	19
2.2.2 Atividades farmacológicas e toxicológicas do látex de <i>P. pudica</i> .....	20
2.3 Efeito anti- e pró-inflamatório do látex de plantas .....	21
2.4 Eventos da inflamação .....	23
2.4.1 Processo inflamatório .....	23
2.4.2 Mediadores químicos do processo inflamatório .....	24
2.4.2.1. Histamina .....	25
2.4.3 Processo inflamatório mediado por células .....	27
3 OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Delineamento experimental .....	30
4.2 Material vegetal .....	30
4.3 Coleta e processamento do látex .....	31
4.4 Eletroforese (SDS-PAGE) para peptídeos (17,5%) .....	32
4.5 Determinação da concentração de proteínas no látex .....	32
4.6 Determinação da concentração de histamina .....	32
4.7 Ensaio biológicos .....	33
4.7.1 Animais .....	33
4.7.2 Aspectos bioéticos .....	33

4.7.3	Caracterização do efeito pró-inflamatório das frações do látex de <i>P. pudica</i> no edema de pata.....	33
4.7.4	Caracterização do efeito anti-inflamatório da fração DLPp no edema de pata.....	34
4.7.5	Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	34
4.7.6	Caracterização do efeito pró-inflamatório no modelo de edema de pata com bloqueador farmacológico.....	35
4.7.7	Inibição do estímulo inflamatório induzido pela fração DLPp por PLPp.....	35
4.7.8	Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD).....	36
4.7.9	Análise Estatística.....	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	Efeito pró-inflamatório das frações do látex de <i>P. pudica</i> .....	37
5.2	Avaliação da atividade de mieloperoxidase no efeito pró-inflamatório de DLPp e PLPp.....	39
5.3	Efeito anti-inflamatório da fração DLPp do látex de <i>P. pudica</i> .....	41
5.4	Inibição do estímulo inflamatório (induzido pela fração DLPp) causado por PLPp e Cloridrato de Prometazina.....	42
5.5	Perfil proteico da fração dialisável do látex de <i>P. pudica</i> .....	44
5.6	Determinação da presença de histamina na fração pró-inflamatória (DLPp) do látex de <i>P. pudica</i> .....	45
6	DISCUSSÃO.....	46
7	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	67



## 1 INTRODUÇÃO

O látex é um fluido, geralmente de aspecto leitoso, produzido por algumas espécies de plantas cuja função ainda não está totalmente esclarecida, mas tem sido relacionado às funções de excreção, secreção, defesa mecânica e bioquímica das plantas contra herbívoros e insetos (BAUER, 2013).

As moléculas encontradas em látex de plantas são muitas. Estes são constituídos de proteínas enzimáticas e não enzimáticas, terpenos, carbonatos, alcaloides, vitaminas, carboidratos, lipídios e aminoácidos (MAZOIR et al., 2008). Várias proteínas já foram identificadas em fluidos laticíferos, como quitinases (VIANA et al., 2017), beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs), glicosidases (GIORDANI; LAFON, 1993), amilases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987) e inibidores de proteinases (SRITANYARAT et al., 2006). Porém, as mais conhecidas e estudadas são as proteinases (LEMOS et al., 2018).

Muitas propriedades farmacológicas de plantas produtoras de látex têm sido relatadas tanto por parte da população como pela comunidade científica. Dentre elas destacam-se atividades antidiarreica, anti-inflamatória, antinociceptiva e antitumoral (SOARES et al., 2005; HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2017; GEBREMESKEL et al., 2018; GHANDEHARI et al., 2018).

O látex da planta *Plumeria pudica* Jacq. (Apocynaceae) tem sido estudado e relevantes propriedades farmacológicas têm sido descritas. O látex desta planta tem sido submetido a fracionamento através de etapas de centrifugação e diálise contra água destilada levando a obtenção de uma fração, ausente de borracha, e com moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Esta fração, caracterizada por ser rica em proteínas, foi denominada Proteínas do Látex de *P. pudica* (PLPp) e nesta foi observada a presença de propriedades anti-inflamatórias em diferentes modelos experimentais (FERNANDES et al., 2015, SANTANA et al., 2018, OLIVEIRA et al., 2019).

Apesar da fração PLPp não ter apresentado toxicidade crônica e subcrônica para camundongos (SOUZA, 2018), existem relatos que mostram a indução de resposta pró-inflamatória associada ao látex de plantas. Alencar e colaboradores

(2006), por exemplo, demonstraram a coexistência dos efeitos anti- e pró-inflamatório em frações distintas do látex de *Calotropis procera*, evidenciando a possibilidade de separação entre seu efeito tóxico e outro benéfico. Em 2018, Brito (2018) iniciou um estudo de caracterização de uma segunda fração do látex de *P. pudica*, aquela não retida no interior da membrana de diálise, e caracterizada por conter moléculas de massa molecular inferior a 8 kDa. A fração denominada Dialisado do Látex de *P. pudica* (DLPP) ainda não foi alvo de investigação quanto a presença de moléculas com ação farmacológica ou tóxica.

Nesse contexto, estudar os efeitos de diferentes frações obtidas de látex plantas no processo inflamatório pode contribuir de forma significativa para o entendimento das reações que podem ser causadas por tais no que se refere tanto à inibição quanto à indução de respostas inflamatórias. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar frações distintas do látex de *Plumeria pudica* quanto a suas propriedades anti- e pró-inflamatória visando explorar ferramentas farmacológicas úteis para a investigação de respostas inflamatórias, assim como, desenvolvimento de futuro de fármacos com efeito anti-inflamatório ou imunoestimulador.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Látex

As plantas que produzem látex são conhecidas como plantas laticíferas, cuja identificação segue em torno de mais de 20.000 plantas (LEWINSOHN, 1991). O látex é caracterizado como um fluido vegetal de aspecto, geralmente leitoso, que flui de dentro de estruturas celulares especializadas chamadas de laticíferos (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008) cuja função tem sido relacionada à produção de substâncias que auxiliam a planta na defesa contra herbívoros e microorganismos (RAMOS et al., 2019).

A coloração (branco, amarelo, vermelho ou incolor) e viscosidade do látex podem variar dependendo da espécie (KONNO, 2011). Alguns deles são tóxicos e corrosivos, como por exemplo, o látex da planta *Euphorbia tirucalli*, conhecida popularmente como aveloz, cuja composição é rica em diterpenos, podendo causar coceira, lesões e edema (COSTA, 2011; TOFANELLI; SILVA, 2011).

Em relação à composição química, a maior parte dos seus constituintes é aproximadamente 55,5% de água, 38% de material sólido (cis-1,4-poliisopreno), 1 – 2% de proteínas e fosfoproteínas, 2% resinas, 1% ácidos graxos, 1% carboidratos, e 0,5% de sais inorgânicos (GREVE, 2012). Observa-se que a composição química do látex não é semelhante para todas as plantas, pois existem espécies que produzem látex ricos em terpenos (1994), carboidratos (ARRUDA et al. 2015) ou proteínas (AZARKAN et al. 1997; FREITAS et al. 2007; MALEK et al. 2016).

Muitos estudos têm utilizado o látex de plantas para investigar suas atividades farmacológicas e, para isso, fazem a separação da fase sólida e líquida para sua caracterização. A partir da fase líquida do látex, alguns grupos de pesquisa têm conseguido separar um “pool” de moléculas de tamanhos variados por meio de diálise, como proteínas acima de 8.000 Da e outros metabólitos menores que esse valor (FREITAS et al., 2007; OLIVEIRA, 2009; SOUZA et al., 2011; FERNANDES, 2014; BRITO, 2018).

Na literatura, é possível encontrar algumas classes de proteínas bioativas que foram isoladas do látex de plantas, como por exemplo, proteinases cisteínicas e

serínicas, peroxidases, quitinases, lectinas e osmotinas (VAN PARIJS et al. 1991; RAMOS et al., 2014; FREITAS et al., 2016; SHUKLA; GUNDAMPATI; JAGANNADHAM, 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Em 1960, Hevein foi a primeira proteína isolada a partir do látex fresco de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como seringueira, pelo pesquisador B. L. Archer (ARCHER, 1960).

## 2.2 *Plumeria pudica*

### 2.2.1 Características gerais

O látex pode ser encontrado em mais de 40 famílias, cerca de 900 gêneros e mais de 20.000 espécies, sendo que destas, aproximadamente 1.000 contêm borracha (ADIWILAGA; KUSH, 1996; HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). As diversas plantas que produzem látex são derivadas das famílias Euphorbiaceae (SABANDAR et al. 2013; FLEMMING et al. 2017; MALI; PANCHAL, 2017), Apocynaceae (OLIVEIRA et al. 2010; CHANDA et al. 2011; WONG et al. 2013; FERNANDES et al. 2015; SANTANA et al. 2018), Papaveraceae (NAWROT, 2017), Moraceae (SHARMA et al. 2009), Convolvulaceae (KUSTER et al. 2016), Asteraceae (GERACI; POLIZZANO; SCHICCHI, 2018) e Araceae (MOON; LEE; CHUN, 2011).

O gênero *Plumeria*, pertencente à família Apocynaceae, é nativo do continente americano e suas plantas são largamente cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais sendo encontrado desde regiões do sul do México até o norte da América do Sul, e é também abundantemente encontrada na Índia. São reconhecidas como excelentes plantas ornamentais, muitas vezes sendo vistas em cemitérios (SANTOS; LISBOA; CARVALHO, 2012; SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014).

A espécie *Plumeria pudica* Jacq. (Figura 1) é nativa da Colômbia, Panamá e Venezuela, mas é bastante popular no Nordeste brasileiro, sul da Flórida (EUA) e no Caribe (FERNANDES et al., 2015; SUAREZ et al., 2017). Apresenta ramos retos com 1 a 3 metros de altura, haste cilíndrica de cor cinza, casca suave, folhas verdes

brilhantes, pecíolo de 1 a 2 cm de comprimento. Suas flores são brancas com centro amarelado e lóbulos redondos ou amplamente elípticos. Esta é conhecida como “Buquê de noiva”, Plumeria folha-de-violino, Plumeria selvagem, Oleandro Bovairiano ou Frangipani Branco. Adapta-se a clima seco e luz solar direta em todo o ano (JOGDAND; DHABE, 2013).

**Figura 1.** Aspecto geral de *P. pudica*.



(A) arbusto (B) frutos e (C) flores. Fonte: Autoria própria.

### 2.2.2 Atividades farmacológicas e toxicológicas do látex de *P. pudica*

Popularmente, *P. pudica* está entre as cinquenta plantas medicinais usadas para o tratamento de patologias ginecológicas na Índia de acordo com Dwivedi e colaboradores (2017). Em relação as suas atividades farmacológicas, o látex de *P. pudica* ainda é pouco estudado. No entanto, algumas dessas atividades têm sido caracterizadas em ensaios *in vivo* por nosso grupo de pesquisa. Fernandes (2014)

fracionou o látex de *P. pudica* através de centrifugação e diálise até obtenção de uma fração caracterizada por conter moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Por ser rica em proteínas, a fração foi denominada Proteínas do látex de *P. pudica* (PLPp). Foi demonstrado que PLPp possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Neste estudo, a fração PLPp inibiu o edema de pata induzido por carragenina de modo dose dependente (melhor dose 40 mg/kg) em um evento que foi acompanhado pela redução da atividade de mieloperoxidase no tecido inflamado. Ainda, PLPp reduziu a inflamação induzida por histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas E<sub>2</sub> (FERNANDES et al., 2015).

Posteriormente, Santana (2018) avaliou seu efeito antidiarreico em camundongos, utilizando modelo de diarreia induzida por óleo de rícino, e mostrou que PLPp apresentam efeito antidiarreico. Além disso, seus efeitos na colite induzida por ácido acético e na periodontite induzida por ligadura em ratos foram demonstrados por Oliveira et al. (2019) e Oliveira (2019), respectivamente.

Em termos de toxicologia, Souza (2018), ao avaliar a toxicidade de PLPp em camundongos, demonstrou que parâmetros de toxicidade como peso corporal dos animais, peso dos órgãos avaliados e contagem total e diferencial de leucócitos não foram alterados em animais tratados por 10 ou 20 dias consecutivos com a fração proteica na mesma dose com ação terapêutica.

A fração DLPp inicialmente estudada por Brito (2018) é caracterizada por moléculas de massa molecular inferior a 8 kDa e apresenta metabólitos secundários, como fenóis e flavonoides. Neste estudo ainda foi demonstrado que DLPp possui ação antioxidante, mas a mesma não foi investigada quanto a presença de moléculas com ação farmacológica ou tóxica.

### **2.3 Efeito anti- e pró-inflamatório do látex de plantas**

As plantas laticíferas têm sido investigadas em relação a diversas atividades biológicas devido aos compostos bioativos presentes em seu látex (CHAVAN; HUNDIWALE; PATIL, 2015). O potencial anti-inflamatório do látex de *Calotropis procera*, por exemplo, tem sido muito estudado por vários grupos de pesquisa. O estudo de Alencar e colaboradores (2004), ao analisar uma fração proteica não-

dialisável em três modelos diferentes de inflamação, demonstrou ter efeito inibitório mediado por células. Outros ensaios mostram seu potencial anti-inflamatório nos modelos de peritonite (RAMOS et al., 2009; OLIVEIRA, 2009; VIANA et al., 2017) edema de pata (ARYA; KUMAR, 2005; KUMAR et al., 2015) e monoartrite (KUMAR; ROY, 2009).

Mais recentemente, o látex de *Aloe megalacantha*, (GEBREMESKEL et al., 2018) e de *Euphorbia helioscopia* (SALEEM et al., 2015) demonstraram reduzir a inflamação induzida por carragenina em camundongos. Quando avaliada em modelos de inflamação e irritação, uma substância isolada a partir do látex de *Plumeria rubra* apresentou efeito anti-inflamatório (AZIZ et al., 2018). A espécie *Hancornia speciosa*, árvore nativa do Brasil, tem seu látex mencionado por apresentar significativa atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação (MARINHO et al., 2011). No látex de *Synadenium carinatum*, foi observada ação anti-inflamatória e antialérgica (ROGERIO et al., 2007).

Salim e colaboradores (2018) desenvolveram uma pomada com o látex de *Jatropha curcas* para o tratamento de lesões de pele em camundongos e verificaram uma redução de infiltrado celular inflamatório nos cortes histológicos analisados. Além disso, o látex de *Jatropha neopauciflora* inibiu o efeito inflamatório durante o processo de cicatrização de feridas em modelo murino (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2017).

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que moléculas presentes em látex podem causar efeito pró-inflamatório. Singh e colaboradores (2000) propuseram um novo modelo para avaliar fármacos anti-inflamatórios ao verificar que o extrato aquoso do látex de *C. procera* promoveu resposta pró-inflamatória dose-dependente quando administrado localmente nos modelos de edema de pata, em evento acompanhado pelo aumento na permeabilidade vascular. Por sua vez, Shivkar e Kumar (2003) relacionaram o mesmo efeito edematogênico observado com a ativação de vias de liberação de aminas vasoativas como a histamina, mas com inibição por interleucina IL-1 (ARYA; KUMAR, 2004). Além disso, respostas imunológicas e alergênicas têm sido observadas quando frações distintas do látex de *C. procera* são administradas por via subcutânea (RAMOS et al., 2007).

Investigando o mesmo efeito desse fluido laticífero, Kumar e Shivkar (2004) mostraram que prostaglandinas estão envolvidas no processo de inflamação com a presença de fluido rico em proteínas e leucócitos acumulado. Outros autores confirmaram mais sinais pró-inflamatórios, como por exemplo, hiperalgesia (SEHGAL; KUMAR, 2005) e derrame pleural com presença de leucócitos infiltrados no modelo de pleurite (SHIVKAR; KUMAR, 2004).

Alencar e colaboradores (2006) também avaliaram o látex de *C. procera* quanto sua ação pró-inflamatória em modelo de peritonite. Duas frações distintas foram obtidas, a fração dialisável e a não-dialisável. A primeira induziu inflamação e a segunda reduziu o efeito inflamatório provocado pela primeira, evidenciando que atividades contrárias são observadas em frações distintas.

A atividade pró-inflamatória do látex de *Cryptostegia grandiflora* foi também investigada por Albuquerque e colaboradores (2009). Proteínas do látex desta planta foram isoladas e testadas em modelos de inflamação (peritonite, edema de pata e impulso de ar) *in vivo*, mostrando que um longo efeito pró-inflamatório foi observado com migração de neutrófilos, permeabilidade vascular e atividade de mieloperoxidase aumentadas em ratos.

Diante dos relatos da presença de atividade pró-inflamatória em fluidos laticíferos, torna-se importante avaliar a presença de atividade pró-inflamatória no látex da planta *P. pudica*.

## **2.4 Eventos da inflamação**

### **2.4.1 Processo inflamatório**

A inflamação é naturalmente considerada uma resposta à lesão causada por microrganismos e/ou trauma (INSEL, 2005). O desencadeamento de uma resposta inflamatória é importante, pois mantém a homeostase do organismo (MEDZHITOV, 2008). Tal resposta é caracterizada pela ação de mediadores pró-inflamatórios que sinalizam não somente a eliminação de patógenos, mas a estimulação do reparo da lesão (SONIS et al., 2004; ABBAS et al., 2008). Embora seja importante no processo de reparo tecidual e na manutenção da homeostase, é evidente que a inflamação



em si acaba tornando-se um sinal para o diagnóstico da maioria das condições patológicas (JANSSEN; HENSON, 2012).

Classicamente, existem sinais inflamatórios típicos que recebem o nome de sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor e perda de função. Esses sinais aparecem devido à ação de diferentes mediadores químicos liberados em resposta à lesão (ANDRADE, 2016).

A partir disso, a inflamação é vista em três fases distintas. Primeiramente, uma fase transitória aguda é desencadeada, cujos principais eventos são vasodilatação local e permeabilidade capilar aumentada. A segunda é a fase subaguda tardia, tendo a predominância de infiltrado de células fagocíticas e leucócitos. Por último, é possível observar uma fase proliferativa crônica, na qual o tecido é degenerado e o estado de fibrose pode ser formado. Naturalmente, as fases transitória aguda e subaguda tardia são esperadas a ocorrer, pois refletem uma resposta celular regulada, permitindo sua identificação por meio de sinais e sintomas locais (SANTOS JÚNIOR, 2003).

#### 2.4.2 Mediadores químicos do processo inflamatório

O processo inflamatório é mediado por várias moléculas, as quais são denominadas mediadores químicos (TEIXEIRA et al., 2003). Alguns podem ser originados a partir dos tecidos, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanoides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos. Por outro lado, os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas são provenientes do plasma (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006; SPINOSA et al., 2006). Uma vez que são substâncias pró-inflamatórias, estas têm sido alvos na terapia de diversas doenças inflamatórias (KAWAHARA et al., 2015; SOUALMIA; EL AMRI, 2018; THANGAM et al., 2018).

O processo inflamatório se dá pela ativação da fase vascular desencadeada após lesão ou infecção do tecido. Isso inclui fluxo e calibre dos vasos da microcirculação alterados de forma rápida ou não, dependendo de quão intensa seja a lesão. Dentre tais alterações, estão a vasoconstrição arteriolar, o qual ocorre inicialmente por poucos segundos; vasodilatação e permeabilidade vascular

aumentada causada por alguns mediadores como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas. Estas moléculas permitem que as células endoteliais se contraíam a fim de que as junções intercelulares se abram (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

Logo após, os esfíncteres pré-capilares são abertos, provocando aumento do fluxo sanguíneo local, o que caracteriza o calor e a vermelhidão. O edema ou inchaço característico ocorre devido ao extravasamento de grande quantidade de água e proteínas provenientes do plasma para o tecido. Esse fenômeno é caracterizado quando íons e moléculas, como água, albumina e fibrinogênio passam para fora do vaso, aumentando a pressão hidrostática local e possibilitando acúmulo de líquido no interstício (MURPHY; WARD, 2006).

Em termos experimentais, existem padrões de permeabilidade vascular previamente conhecidos que norteiam a investigação de propriedades anti- e pró-inflamatórias de muitas moléculas ainda desconhecidas. Em uma resposta inflamatória natural, diferentes padrões podem ser desencadeados. Dessa forma, esses padrões são classificados de acordo com mediadores químicos liberados pela lesão do vaso. Em picadas de insetos e aracnídeos, aquecimento da pele, erupção alérgica e na urticária, por exemplo, a resposta é do tipo imediata transitória, a qual é iniciada entre cinco e dez minutos e terminada dentro de trinta minutos, e está associada à liberação de histamina, serotonina ou bradicinina (MAJNO; PALADE, 1961; BECHARA; SZABÓ, 2006; WOLOSKI; BURMAN; ADEBONA, 2018).

#### 2.4.2.1. Histamina

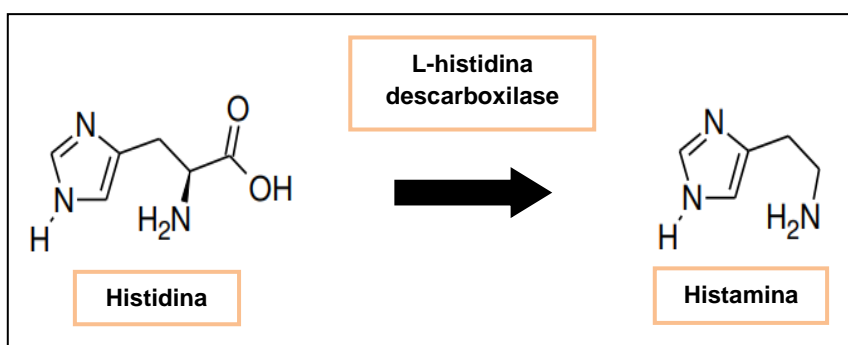
A histamina é uma amina vasoativa derivada do aminoácido histidina (Figura 2) e tem como principal fonte os mastócitos e basófilos. Apresenta efeitos ao se ligar aos seus receptores (HR1, HR2, HR3 e HR4), mantendo os efeitos de fase aguda durante processos inflamatórios (JUTEL; BBLASER; AKDIS, 2005; GILFILLAN; METCALFE, 2011; CARDOZO et al., 2013). O receptor H1, por exemplo, está associado a sintomas de doenças alérgicas, como prurido. Mais especificamente, o receptor H2 tem envolvimento na produção de citocinas por linfócitos Th1, enquanto o receptor H3 participa principalmente da função de barreira hematoencefálica. Por

fim, o receptor H4 tem maior expressão em mastócitos, os quais produzem citocinas e histamina de forma exacerbada quando estes são estimulados. Dessa forma, os receptores H1 e H4 participam essencialmente no desencadeamento de doenças alérgicas mediadas por histamina no que tange à sua progressão e modulação (THANGAM et al., 2018).

As aminas vasoativas são moléculas de baixo peso molecular, compostas basicamente por nitrogênio com presença de grupos alquila e/ou arila. Sua formação se dá quando aminoácidos livres são descarboxilados enzimaticamente e/ou quando aldeídos e cetonas sofrem transaminação. Estas são provenientes do metabolismo proteico de microorganismos, plantas e animais e atuam fisiologicamente em vários processos (ERDAG; MERHAN; YILDIZ, 2018).

No metabolismo vegetal, têm participação na floração, desenvolvimento do fruto, resposta ao estresse e síntese de metabólitos secundários (HUI; SHERKAT, 2005). Um exemplo disso é o fato de que aminas vasoativas, como a histamina, têm sido detectadas em plantas (SCHMIDT; MOULT, 1983; SHIVKAR; KUMAR, 2003; FU et al., 2006). Dessa forma, é importante a pesquisa desses compostos no sentido de correlacioná-los às propriedades anti- e/ou pró-inflamatórias observadas em amostras vegetais.

**Figura 2.** Origem molecular da histamina.



Fonte: Adaptado de CARDOZO et al. (2013)

### 2.4.3 Processo inflamatório mediado por células

Para que eventos da inflamação relacionados à vascularidade, exsudação de líquidos e reparação tecidual ocorram, células de defesa como neutrófilos, mastócitos e macrófagos participam desse processo (JANSSEN; HENSON, 2012; ANDRADE, 2016).

Quando um patógeno se instala em um tecido, este precisa ser debelado pelo organismo. Isso ocorre pela ação de células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), pertencentes ao sistema imune inato, que infiltram-se através de vênulas pós-capilares por meio da liberação e resposta aos diferentes mediadores químicos (CHAVAKIS et al., 2009; ZARBOCK; LEY, 2009).

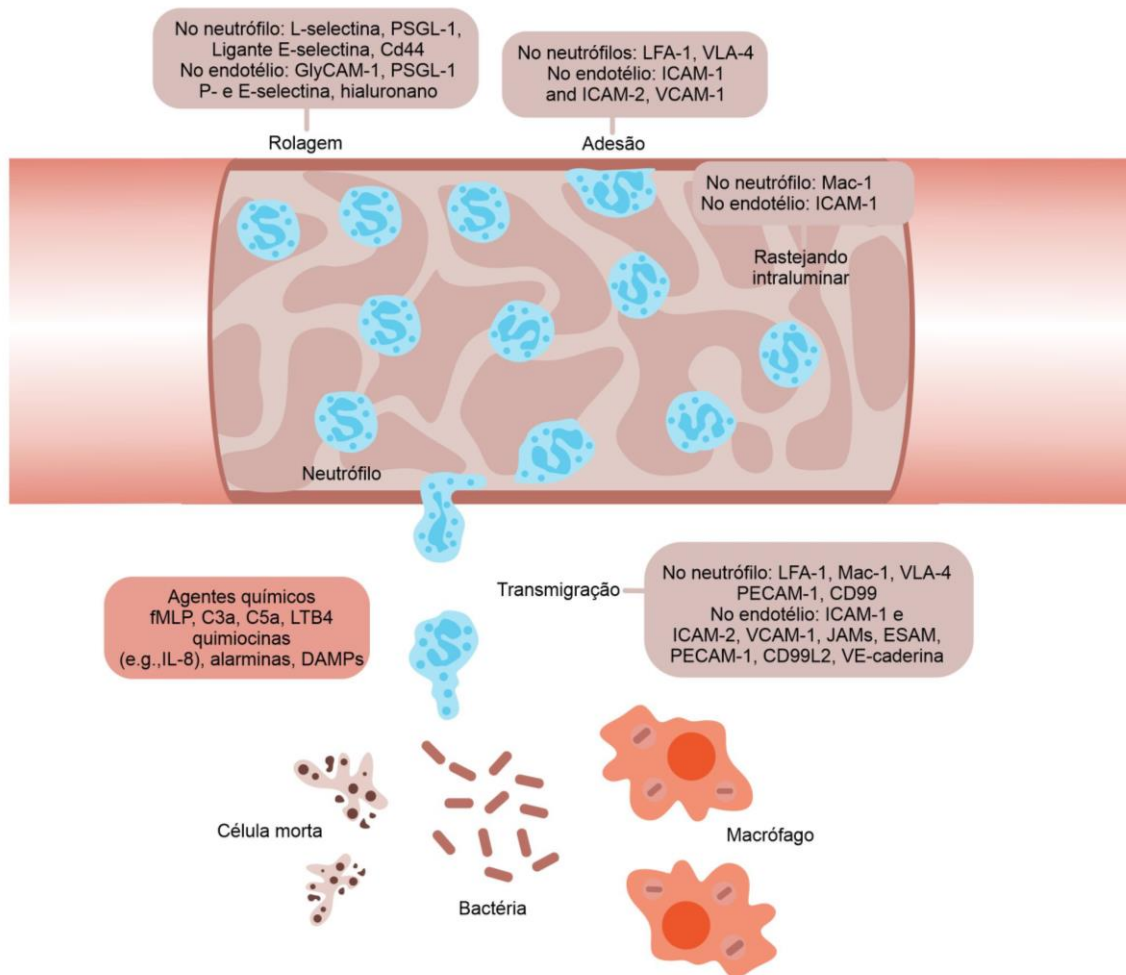
Esta infiltração é chamada de diapedese. Esse fenômeno é parte do processo de recrutamento celular (Figura 3), o qual é formado por diversas etapas. Inicialmente, leucócitos circulantes ligam-se a selectinas presentes na superfície de células endoteliais e, dessa forma, ficam à margem do endotélio vascular. Em seguida, os leucócitos são ativados por quimiocinas, a fim de que fiquem aderidos firmemente por integrinas e a etapa de rolagem aconteça. Por último, ocorre o processo de diapedese, que se caracteriza pela migração tecidual por entre os espaços interendoteliais, migrando para a matriz extracelular (LEY et al., 2007; CHAVAKIS et al., 2009; ANDRADE, 2016).

Secundariamente, outras células podem estar envolvidas em processos de inflamação, como por exemplo, os mastócitos. Estes têm maior participação em reações alérgicas do que durante processos autoimunes e inflamatórios (BENOIST; MATHIS, 2002; WOOLLEY, 2003). No processo alérgico, os mastócitos reconhecem receptores de superfície para anticorpos IgE e, posteriormente, sofrem a degranulação, liberando o conteúdo de mediadores vasoativos, pró-inflamatórios e nocivos como histamina, citocinas e enzimas proteolíticas (KOBAYASHI et al., 2000; GALLI et al., 2002).

Por sua vez, os macrófagos têm sido associados a processos de inflamação e formação de novo tecido. Estes atuam no tecido lesionado por induzir a síntese de várias moléculas sinalizadoras (fatores quimiotáticos, regulatórios e de crescimento),

a fim de que estas moléculas induzam células inflamatórias e células de reparo tecidual (fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos) (HART, 2002).

**Figura 3.** Recrutamento de leucócitos para o local da lesão.



Fonte: Adaptado de PHILLIPSON; KUBES (2011)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Fracionar o látex da planta *Plumeria pudica* Jacq. visando à investigação das atividades pró- e anti-inflamatória e avançar na caracterização dos mecanismos pelos quais estas promovem seus eventos biológicos.

#### 3.2 Objetivos específicos

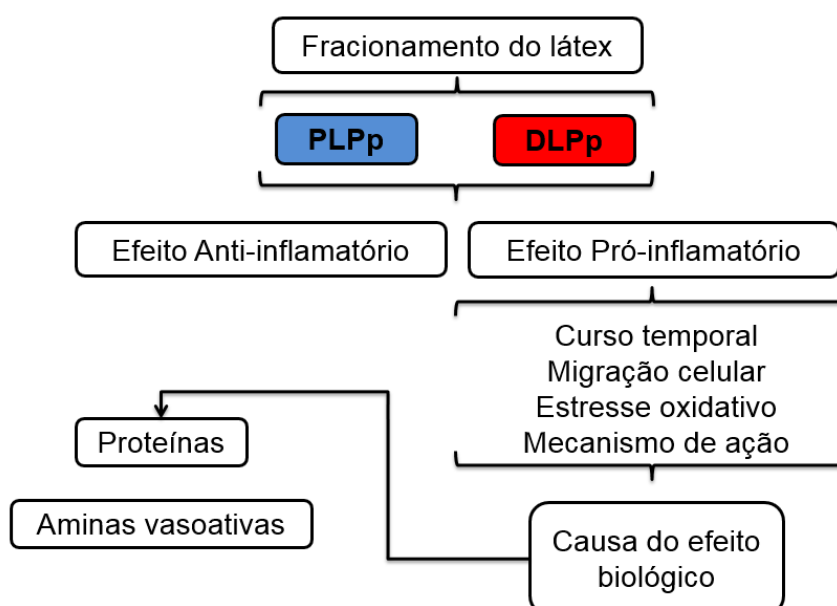
- ✓ Coletar e fracionar o látex de *P. pudica* através de etapas de centrifugação e diálise para obtenção de duas frações com massas moleculares distintas (DLPp e PLPp);
- ✓ Avaliar as frações quanto à concentração e o perfil de proteínas/peptídeos por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- ✓ Investigar a presença de atividade pró-inflamatória nas frações DLPp e PLPp e atividade anti-inflamatória de DLPp utilizando o modelo de edema de pata em camundongos;
- ✓ Caracterizar o mecanismo de ação pró-inflamatória das frações utilizando fármaco anti-inflamatório específico;
- ✓ Investigar a capacidade da fração PLPp, detentora de ação anti-inflamatória, de inibir inflamação induzida por DLPp;
- ✓ Detectar a presença de compostos semelhantes à histamina por meio de espectrofotometria.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

O estudo em questão foi desenhado de forma a responder as perguntas feitas conforme mostradas na Figura 4. Este apresenta como pontos principais o fracionamento do látex, avaliação das atividades anti- e pró-inflamatória e entendimento da causa do efeito biológico encontrado.

**Figura 4.** Desenho experimental do estudo.



Fonte: Autoria própria.

### 4.2 Material vegetal

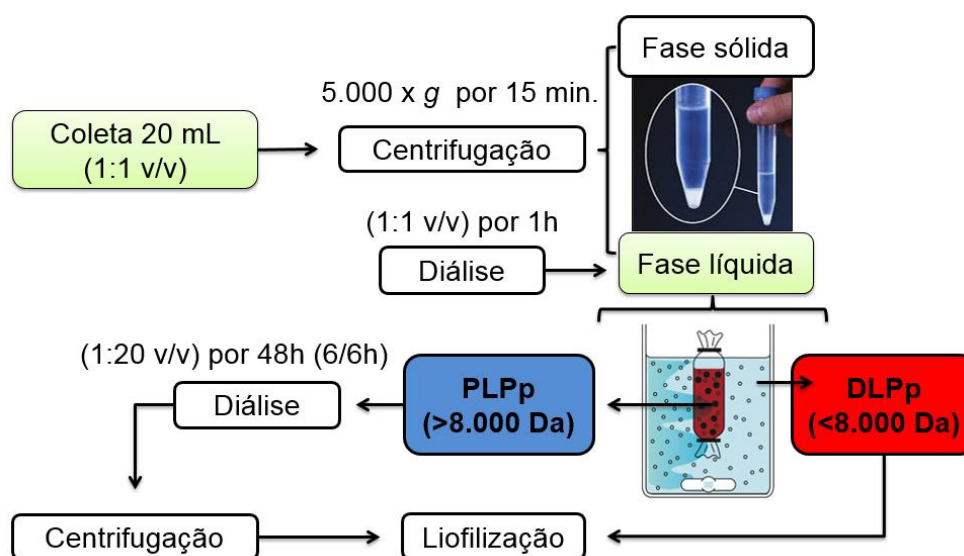
Amostras do látex de *Plumeria pudica* Jacq. foram coletadas na cidade de Parnaíba - PI (02° 54' 17" S e 41° 46' 36" O), onde é abundantemente encontrada. Uma exsicata da planta (Nº 2432) foi depositada no Herbário Delta do Parnaíba da Universidade Federal do Piauí.

### 4.3 Coleta e processamento do látex

O látex de *P. pudica* foi coletado de acordo com a descrição de Oliveira (2011) como demonstrado na Figura 5. Galhos da planta foram cortados e 10 mL de látex foram coletados em tubos do tipo Falcon contendo 10 mL de água destilada (1:1 v/v) a fim de que o processo natural de coagulação do látex fosse minimizado.

Para obtenção de duas frações laticíferas diferentes, o processamento foi iniciado com a centrifugação da amostra a 5.000 x g durante 15 minutos, descartando-se o primeiro precipitado (borracha). Para separar moléculas proteicas de metabólitos secundários, a diálise do sobrenadante obtido contra água destilada (1:1 v/v) foi realizada, por meio de uma membrana capaz de reter moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Após uma hora de diálise, a água proveniente foi recuperada e liofilizada. A essa primeira fração foi dado o nome de fração Dialisável do Látex de *Plumeria pudica* (DLPP). A partir dessa etapa, o material retido na membrana permaneceu sob diálise em água destilada (1:20 v/v) durante 48 horas a 8° C, sendo a água periodicamente trocada a cada 6 horas. A segunda centrifugação ocorreu sob as mesmas condições anteriores, obtendo-se uma nova fração, a qual foi liofilizada e chamada de Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (PLPp).

**Figura 5.** Processo de coleta e processamento do látex de *Plumeria pudica*.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA (2011).



#### **4.4 Eletroforese (SDS-PAGE) para peptídeos (17,5%)**

Para avaliar o perfil proteínas/peptídeos da fração DLPP, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) adaptada de Santana (2016). O gel de empilhamento foi preparado com poliacrilamida 3,5% e tampão Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) contendo 10% de SDS. O gel de separação, por sua vez, foi composto por poliacrilamida 17,5% e montado em uma solução tampão Tris-HCl 3M (pH 8,8) contendo 10% de SDS. 20 mg da fração DLPP foi dissolvida em 150  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,0625M (pH 6,8) contendo 2% de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol e 150  $\mu$ L de água destilada. Logo após, a fração foi aplicada no interior dos poços do gel, sendo submetidas a uma voltagem constante de 100V e 25mA por placa à temperatura ambiente, utilizando Tris-HCl 0,025M pH 8,3, contendo 0,192M de glicina e 0,1% de SDS, como tampão de corrida. Após a eletroforese, o gel foi corado com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-350 0,1% solubilizado em água: ácido acético: metanol (8:1:3,5 v/v/v) durante 4 horas e depois descorados com a mesma solução na ausência do corante para visualização das bandas proteicas.

#### **4.5 Determinação da concentração de proteínas no látex**

A quantidade de proteínas solúveis na fração DLPP foi detectada por meio do método de Bradford (1976) em triplicata. O método se baseia na ligação do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 às proteínas presentes na solução e mudança de coloração (marrom para azul). Em seguida, o aumento da absorbância lida em 595 nm é monitorada.

#### **4.6 Determinação da concentração de histamina**

Uma vez que aminas vasoativas têm sido detectadas no látex de plantas (SHIVKAR; KUMAR, 2003), a presença de histamina foi investigada na fração DLPP, como descrito por Jannatin, Supriyanto e Pudjiastuti (2017) com modificações, por meio de espectrofotometria. Para quantificar histamina, foram utilizados 1000  $\mu$ L de

tampão contendo 1M de Fosfato de Sódio Monobásico e 1M de Fosfato de Sódio Dibásico (pH 7), 1000 µL de Cobre II penta-hidratado a 0,05 M, 250 µL de Vermelho de Alizarina S a 0,04 M e 1250 µL da fração DLPp (300µg/50µl) diluída em metanol. A leitura foi realizada a 505,5 nm após 10 minutos de reação. O composto histamina foi utilizado como padrão, sendo o ensaio realizado em triplicata.

## 4.7 Ensaios biológicos

### 4.7.1 Animais

A fim de avaliar os efeitos de inflamação do látex de *P. pudica*, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25-30g com grupos experimentais compostos por cinco animais. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella e mantidos no Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso. Para os ensaios, as amostras foram solubilizadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%).

### 4.7.2 Aspectos bioéticos

O estudo foi realizado seguindo procedimentos e protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA-UFPI), sob o número de protocolo 318/17 (ANEXO I). Os ensaios foram conduzidos conforme as diretrizes do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O método de eutanásia utilizado se baseou na administração combinada dos anestésicos Ketamina (3 x 60mg/kg) e Xilazina (3 x 10mg/kg) por via intraperitoneal, confirmando-se o procedimento pela ausência de batimentos cardíacos.

4.7.3 Caracterização do efeito pró-inflamatório das frações do látex de *P. pudica* no edema de pata

Os ensaios foram conduzidos de acordo com Winter, Risley e Nuss (1962) com modificações. Os volumes das patas traseiras direitas de cada animal foram medidos em pletismômetro digital (Modelo LE 7500, Panlab, Barcelona, Espanha) antes da injeção dos estímulos inflamatórios (tempo zero). Um volume de 50µL de diferentes concentrações de PLPp (100, 300, 500 µg/pata) e DLPp (100, 300, 500 µg/pata) foram injetados por via intraplantar. Os volumes das patas foram medidos após 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a administração das frações. O edema foi calculado como variação de volume, ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e volume antes do estímulo (tempo zero). O grupo controle (solução salina estéril) também recebeu o mesmo volume na pata. Após o ensaio, os animais foram eutanasiados e o tecido da face plantar da pata foi coletado para dosagens de mieloperoxidase (MPO).

#### 4.7.4 Caracterização do efeito anti-inflamatório da fração DLPp no edema de pata

Baseado na metodologia descrita por Winter, Risley e Nuss (1962), a atividade anti-inflamatória foi determinada. O edema de pata foi induzido pela administração de carragenina (500µg/pata), o qual foi solubilizado em solução salina estéril (NaCl 0.9%), injetando-se 50µL na pata traseira direita. O volume da pata foi lido antes da injeção e 1, 2, 3, e 4 h depois da administração de carragenina por meio de um pletismômetro. Um volume de 500 µL da fração DLPp (10, 20 e 40 mg/kg) foi injetado por via intraperitoneal (i.p.) 1 h antes da injeção de carragenina. O grupo controle recebeu solução salina estéril. A expressão dos resultados se deu pela subtração do aumento do volume da pata pelo volume no tempo basal. Após o ensaio, os animais foram eutanasiados e o tecido da face plantar da pata foi coletado para dosagens de MPO.

#### 4.7.5 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A dosagem da atividade de MPO foi conduzida conforme metodologia descrita por Bradley e colaboradores (1982). Para mensurar a concentração desta enzima,

50 a 100mg do tecido da pata dos animais foram homogeneizadas em solução tampão de brometo de haxadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB). O material foi macerado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram pipetados em placa e 200 µL da solução de leitura (27 mL de água + 5 mg de O-dianisina em 3 mL de fosfato de potássio + 15 µL de peróxido de hidrogênio). Os resultados foram obtidos em um leitor de ELISA e expressos em UMPO/mg de tecido.

#### 4.7.6 Caracterização do efeito pró-inflamatório no modelo de edema de pata com bloqueador farmacológico

Para o estudo do mecanismo de ação pró-inflamatória, camundongos foram pré-tratados com um fármaco cujo respectivo mecanismo de ação sobre a resposta inflamatória é bem compreendido. A metodologia foi baseada conforme Canabrava, Oliveira e Canabrava (2008). Os animais receberam 5 mg/kg de Cloridrato de Prometazina por via intraperitoneal 30 minutos antes de receberem DLPP (melhor dose) na pata traseira direita por via intraplantar. Após 30 minutos da indução inflamatória por DLPP, os volumes das patas traseiras direitas de cada animal foram medidos em pletismômetro. Os animais foram eutanasiados e o tecido da face plantar da pata foi coletado para dosagens bioquímicas. O grupo controle recebeu solução salina estéril.

#### 4.7.7 Inibição do estímulo inflamatório induzido pela fração DLPP por PLPP

Sabendo que a fração de alta massa molecular (PLPP) apresenta efeito anti-inflamatório (Fernandes et al., 2015), os animais receberam PLPP (40 mg/kg, dose anteriormente demonstrada apresentar melhor efeito) por via intraperitoneal 1 hora antes de receberem DLPP (300 µg), por via intraplantar. Os volumes das patas traseiras direitas de cada animal foram medidos em pletismômetro após 30 minutos após a administração de DLPP. O edema foi calculado como variação de volume, ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e volume antes do estímulo (tempo zero). Grupo controle recebeu somente solução

salina estéril, por via intraplantar. Após ensaio os animais foram eutanasiados e o tecido da face plantar da pata foi coletado para dosagens bioquímicas.

#### 4.7.8 Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Das, Samanta e Chainy (2000). Caracteriza-se por ser um ensaio colorimétrico, em que radicais superóxidos são gerados por fotorredução da riboflavina sendo detectados pelo nitrito formado a partir de cloridrato de hidroxilaminados.

#### 4.7.9 Análise Estatística

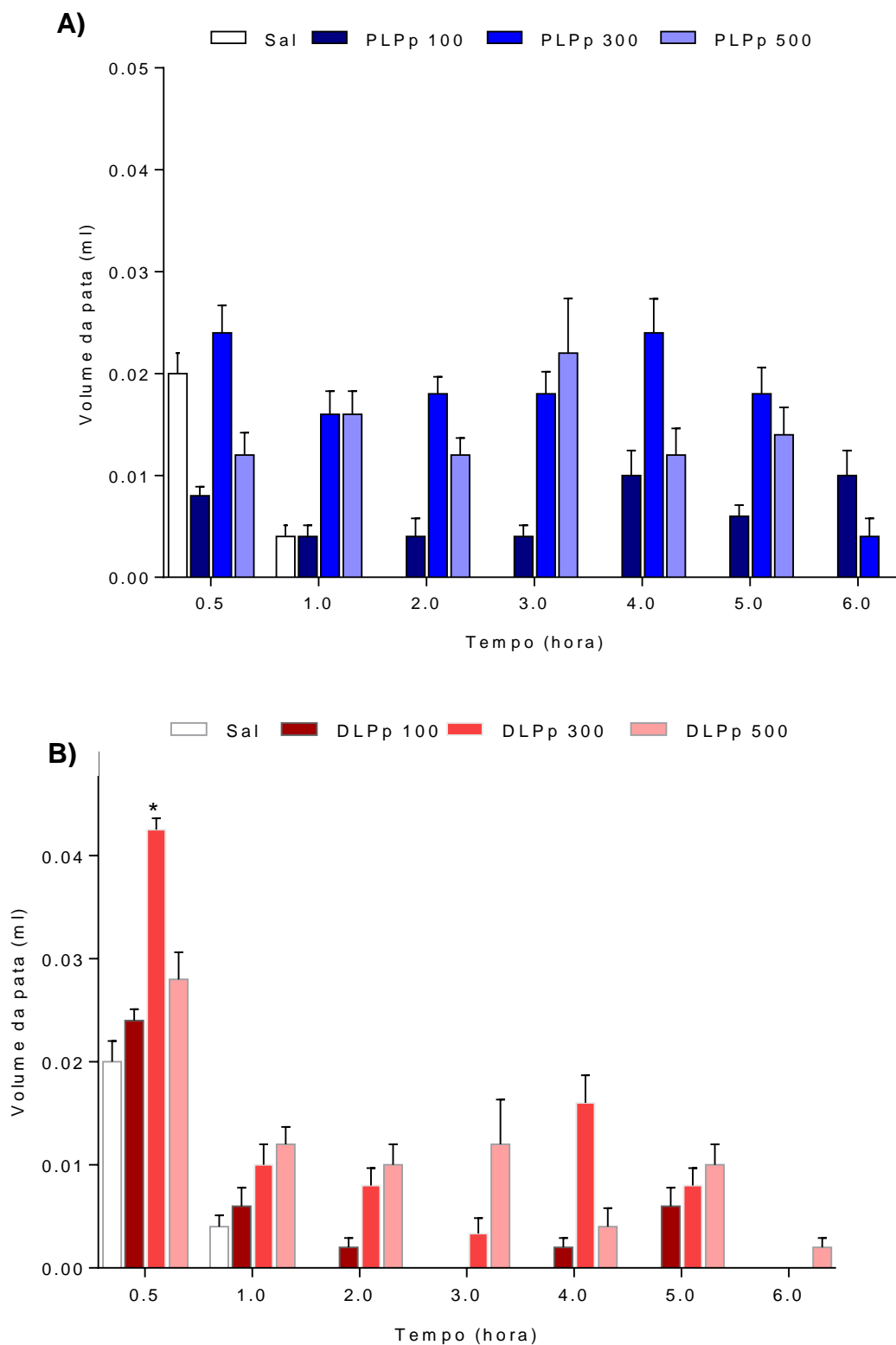
Para todos os ensaios realizados foram utilizados grupos de  $n=5$  e os dados obtidos foram calculados como média  $\pm$  E.P.M. de um número de eventos em cada grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Neuman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito pró-inflamatório das frações do látex de *P. pudica*

A ação inflamógena das frações do látex de *P. pudica* foi verificada no modelo de edema de pata em camundongos. O curso temporal de desenvolvimento de edema induzido pelas frações PLPp e DLPp é mostrado na Figura 6A e 6B, respectivamente. A fração PLPp não demonstrou ter efeito edematogênico significativo ( $p > 0,05$ ) nas concentrações administradas (100, 300 e 500  $\mu\text{g/pata}$ ) durante as 6 horas de avaliação quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a fração DLPp apresentou um curso temporal significativo ( $p < 0,05$ ) com pico edematogênico, ocorrendo nos primeiros trinta minutos após administração de DLPp na concentração de 300  $\mu\text{g/pata}$  quando comparado ao grupo salina. Isso pode ser percebido quando os volumes das patas dos animais são comparados com o grupo salina ( $0,020 \pm 0,00 \Delta\text{mL}$ ) e o grupo DLPp 300 ( $0,044 \pm 0,01 \Delta\text{mL}$ ). A Figura 7B mostra a pata traseira direita do animal com uma leve tumefação em toda sua extensão.

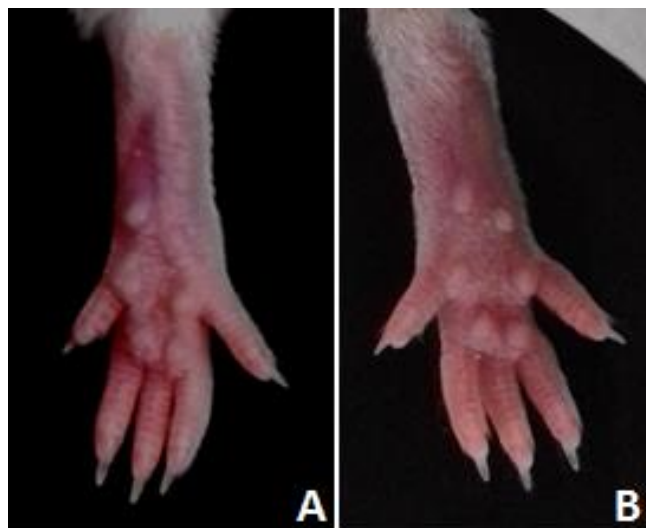
**Figura 6.** Efeito da indução de edema de pata pelas frações do látex de *P. pudica*.



Os animais receberam (A) PLPp: proteínas do látex de *P. pudica* (100, 300 e 500 $\mu$ g/pata); (B) DLPp: fração dialisável do látex de *P. pudica* (100, 300 e 500 $\mu$ g/pata) e Sal: solução salina (NaCl 0,9%) por via intraplantar. Os valores foram dados como a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5) analisados por ANOVA

seguido do teste de Newman Keuls. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina.

**Figura 7.** Efeito da indução de edema de pata pela fração DLPP após 30 minutos.



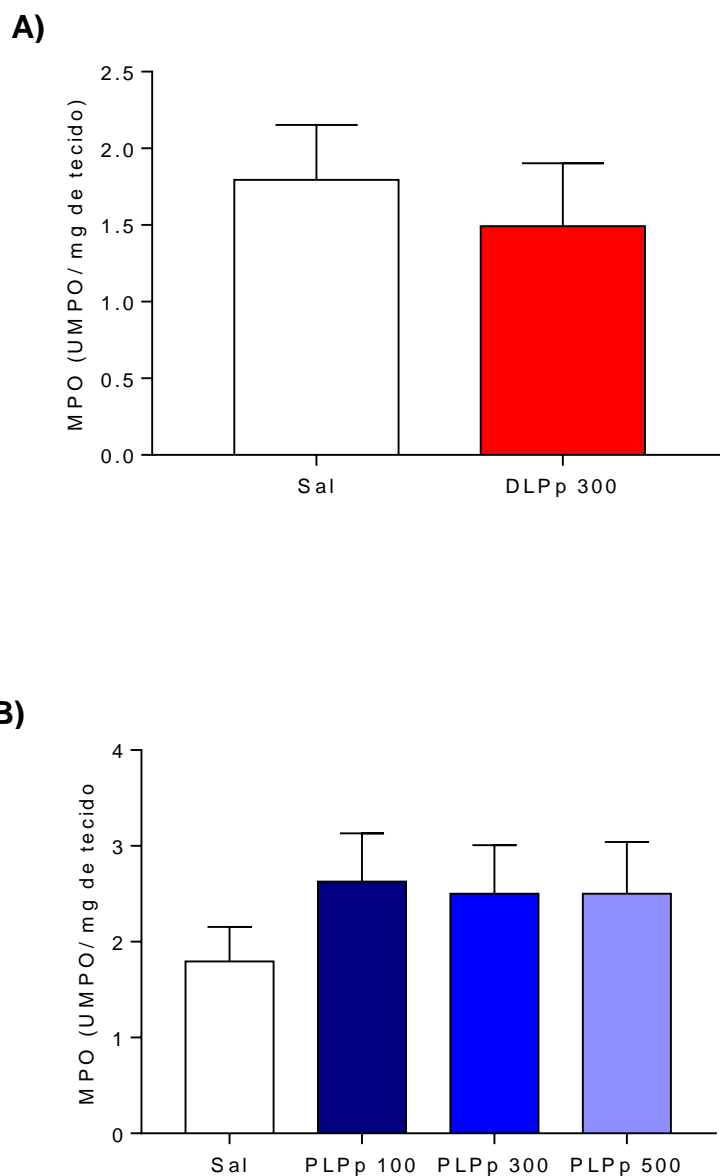
Imagens representativas de cada grupo de animais: (A) Pata normal; (B) Fração dialisável do látex de *P. pudica* (DLPP 300  $\mu\text{g/pata}$ ).

## 5.2 Avaliação da atividade de mieloperoxidase no efeito pró-inflamatório de DLPP e PLPP.

A atividade de MPO foi investigada a partir de tecido plantar coletado da pata dos animais nos primeiros trinta minutos após administração da fração DLPP (Figura 8 A) e da fração PLPP na sexta hora (Figura 8 B). Os grupos PLPP 100  $\mu\text{g/pata}$  ( $2,63 \pm 0,50$  UMPO/mg de tecido), 300  $\mu\text{g/pata}$  ( $2,50 \pm 0,50$  UMPO/mg de tecido) e 500  $\mu\text{g/pata}$  ( $2,50 \pm 0,54$  UMPO/mg de tecido) e o grupo DLPP 300 ( $1,49 \pm 0,41$  UMPO/mg de tecido) não foram capazes de alterar os níveis de MPO de forma significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina ( $1,80 \pm 0,36$  UMPO/mg de tecido).



**Figura 8.** Determinação da atividade de mieloperoxidase no efeito pró-inflamatório de DLPp e PLPp.

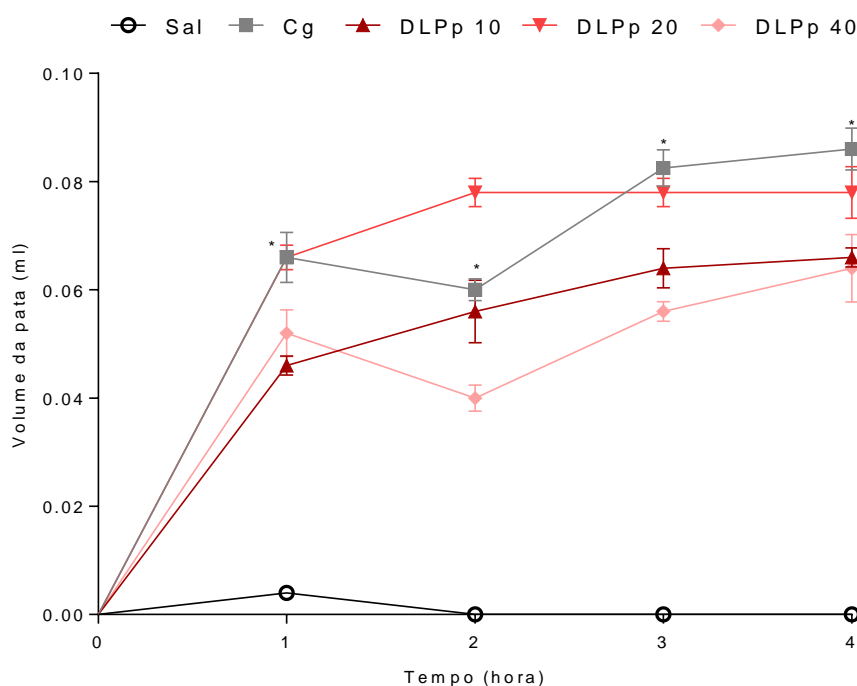


Os animais tratados com (A) DLPp: fração dialisável do látex de *P. pudica* (300  $\mu$ g/pata) e (B) PLPp: proteínas do látex de *P. pudica* (100, 300 e 500 $\mu$ g/pata). A eutanásia foi realizada nos grupos DLPp e PLPp após 30 minutos e 6 horas, respectivamente. Amostras do tecido plantar das patas direitas traseiras foram retirados para determinar a atividade de mieloperoxidase. Os valores foram dados como a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5) analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls.

### 5.3 Efeito anti-inflamatório da fração DLPP do látex de *P. pudica*

Em relação à atividade anti-inflamatória da fração de menor massa molecular, foi possível observar na Figura 9 que não houve redução significativa do efeito edematogênico induzido pela administração intraplantar de carragenina ( $0,076 \pm 0,01 \Delta\text{mL}$ ) quando tratado com DLPP 10 ( $0,064 \pm 0,01 \Delta\text{mL}$ ), DLPP 20 ( $0,078 \pm 0,01 \Delta\text{mL}$ ) e DLPP 40 ( $0,056 \pm 0,00 \Delta\text{mL}$ ). Diferença significativa foi observada somente entre o grupo carragenina e o grupo salina ( $0,000 \pm 0,00 \Delta\text{mL}$ ). Segundo Di Rosa (1972), a formação do pico da resposta inflamatória pela carragenina ocorre entre a terceira e quarta hora após o processo inflamatório ser induzido. Dessa forma, não foi visto inibição de edema entre esse intervalo após a indução por carragenina, como pode ser também mostrado na Figura 10.

**Figura 9.** Efeito anti-inflamatório da fração DLPP no edema de pata induzido por carragenina.



Os animais receberam Sal: solução salina (NaCl 0,9%) e Cg: carragenina nas patas por via intraplantar. Os animais foram tratados 1 hora antes com DLPP: fração dialisável do látex de *P. pudica* (10, 20 e 40 mg/kg). Os valores foram dados como a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5$ ) analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina.

**Figura 10.** Efeito anti-inflamatório da fração DLPP no edema de pata induzido por carragenina na 3ª hora de tratamento.



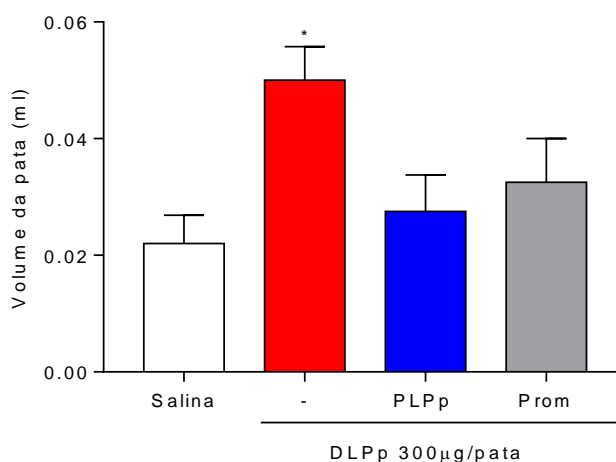
Imagens representativas de cada grupo de animais: (A) Salina; (B) Carragenina; (C) Tratamento com DLPP 10 mg/kg; (D) Tratamento com DLPP 20 mg/kg; (E) Tratamento com DLPP 40 mg/kg.

#### **5.4 Inibição do estímulo inflamatório (induzido pela fração DLPP) causado por PLPP e Cloridrato de Prometazina**

A Figura 11 mostra como o efeito edematogênico induzido por DLPP foi inibido por moléculas conhecidas por apresentarem propriedades anti-inflamatórias. Primeiramente, é possível notar que o grupo de animais que recebeu somente a fração DLPP apresentou efeito edematogênico significativo ( $0,048 \pm 0,00 \Delta\text{mL}$ ) em relação ao grupo controle ( $0,022 \pm 0,00 \Delta\text{mL}$ ). Embora os grupos PLPP 40 mg/kg ( $0,036 \pm 0,01 \Delta\text{mL}$ ) e Cloridrato de Prometazina ( $0,036 \pm 0,01 \Delta\text{mL}$ ) não apresentaram valores significativos ( $p > 0,05$ ), estes demonstraram tendência de redução do efeito pró-inflamatório de DLPP nos primeiros 30 minutos após sua administração.

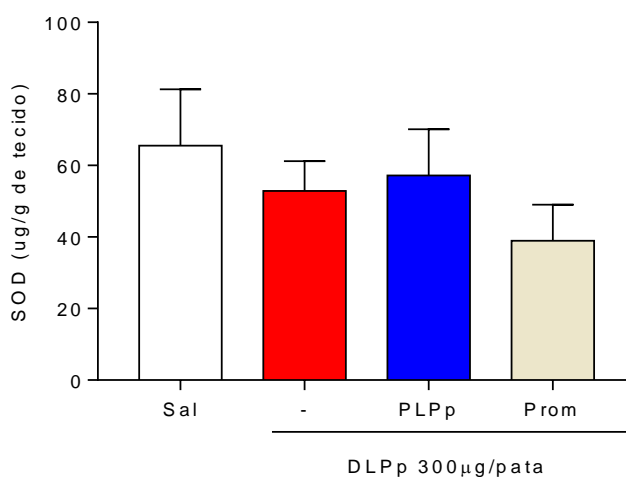
Em relação à atividade de superóxido dismutase (Figura 12), não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o grupo que recebeu somente DLPP ( $52,89 \pm 3,74 \mu\text{g/g}$  de tecido) comparado com o grupo salina ( $65,50 \pm 7,05 \mu\text{g/g}$  de tecido), assim como, não houve diferença dos grupos tratados com 40 mg/kg de PLPP ( $49,15 \pm 9,49 \mu\text{g/g}$  de tecido) e Cloridrato de Prometazina ( $33,27 \pm 6,91 \mu\text{g/g}$  de tecido) em relação ao grupo que recebeu somente DLPP.

**Figura 11.** Inibição do efeito pró-inflamatório de DLPP por moléculas anti-inflamatórias avaliado em 30 min.



Os animais receberam Sal: salina e DLPP (fração dialisável do látex de *P. pudica* 300µg/pata) por via intraplantar e foram pré-tratados com diferentes moléculas com atividade anti-inflamatória conhecida por via intraperitoneal. (-): grupo não-tratado; PLPp: proteínas do látex de *P. pudica* (40 mg/kg); Prom: cloridrato de prometazina (5 mg/kg). Os valores foram dados como a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5) analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina.

**Figura 12.** Determinação da atividade de superóxido dismutase no efeito pró-inflamatório de DLPP avaliado em 30 minutos.



Os animais foram tratados com PLPp: proteínas do látex de *P. pudica* (40 mg/kg) e Prom: cloridrato de prometazina (5 mg/kg) foram eutanasiados e amostras do tecido plantar de suas patas direitas traseiras foram retiradas para determinar a atividade de superóxido dismutase. Os valores foram dados como a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5) analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls.

### 5.5 Perfil proteico da fração dialisável do látex de *P. pudica*

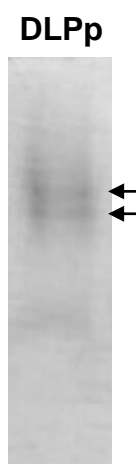
A Tabela 1 mostra a concentração de proteínas solúveis presentes na fração dialisável do látex de *P. pudica*. O valor médio é de 6,9 µg de proteínas a cada 100µL da fração DLPP. Por outro lado, o perfil de proteínas/peptídeos da mesma fração é revelado por eletroforese SDS-PAGE. É possível observar a presença de duas bandas de natureza proteica no gel (Figura 12).

**Tabela 1.** Concentração de proteínas totais da fração dialisável do látex de *P. pudica* (DLPP).

DLPP	Concentração proteica (µg/100µL)
Amostra 1	7,5
Amostra 2	6,3
Amostra 3	7,1
Média	6,9 ± 0,3

O valor de concentração proteica (média ± E.P.M.) foi determinado em triplicata, sendo estimado a partir de uma solução aquosa da fração DLPP de 20 mg/mL.

**Figura 13.** Eletroforese para peptídeos em gel de poliacrilamida (17,5%) da fração dialisável do látex de *P. pudica* (DLPP).



A fração foi dissolvida em água destilada e tampão Tris-HCl 0,0625M (pH 6,8) contendo 2% de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol, sendo que 2,4 µg de conteúdo proteico foi aplicado nos poços do gel, o qual foi corado com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-350 0,1%.

## 5.6 Determinação da presença de histamina na fração pró-inflamatória (DLPP) do látex de *P. pudica*

Concomitantemente à identificação de compostos de natureza proteica, a presença de histamina foi determinada na fração DLPP através de ensaio colorimétrico a fim de verificar a existência de compostos classicamente pró-inflamatórios (Tabela 2). Seu valor médio foi de 22,7 µg por mL da fração.

**Tabela 2.** Concentração de histamina da fração dialisável do látex de *P. pudica* (DLPP).

DLPP	Histamina (µg/mL)
Amostra 1	23,0
Amostra 2	22,5
Amostra 3	22,7
Média	22,7 ± 0,2

O valor de concentração de histamina (média ± E.P.M.) foi determinado em triplicata, sendo estimado a partir de uma solução metanólica da fração DLPP de 6 mg/mL.

## 6 DISCUSSÃO

O látex de plantas tem sido explorado pelo seu potencial farmacológico em modelos de inflamação. Isso é notável em estudos que mostram tanto o potencial de moléculas laticíferas em reduzir o processo inflamatório como de induzi-lo (SINGH; AZIZ et al., 2018). No presente estudo, somente a fração dialisável do látex de *P. pudica* (DLPP) apresentou ação pró-inflamatória no modelo de edema de pata enquanto PLPP, anteriormente mostrada por inibir eventos inflamatórios (FERNANDES et al., 2015), não apresentou efeito pró-inflamatório.

O látex é um fluido heterogêneo composto por várias moléculas e pode apresentar atividades distintas em modelos de inflamação. Isso pode ser evidenciado no estudo realizado por Alencar e colaboradores (2006), em que observaram a coexistência dos efeitos anti- e pró-inflamatório no látex de *Calotropis procera*, promovidas por moléculas de tamanhos diferentes e que foram separadas utilizando procedimento experimental semelhante ao desenvolvido aqui.

A fim de avaliar o envolvimento da migração de células de defesa no processo inflamatório desencadeado por DLPP, foi realizado o ensaio de quantificação da atividade da mieloperoxidase. Esta é uma enzima oxidativa tida como um marcador indireto de migração celular, pois é sintetizada e armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (KLEBANOFF, 2005). Tal participação celular é tida como pico de resposta da fase tardia da inflamação (3ª e 4ª hora) (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971), em que há acentuada migração de neutrófilos (DI ROSA, 1972; KULINSKY, 2007). Os resultados obtidos demonstraram que não houve alteração da atividade de MPO quando DLPP foi injetada na pata do animal, sugerindo que não há envolvimento de células de defesa no efeito pró-inflamatório estudado. Os dados obtidos foram diferentes daqueles encontrados por Alencar e colaboradores (2006), ao observarem, no modelo de peritonite, que a fração dialisável do látex de *C. procera* apresentou efeito pró-inflamatório, mas com um aumento significativo na contagem de células.

Considerando que o pico edematogênico da fração DLPP foi formado nos primeiros 30 minutos do processo inflamatório, foram conduzidos ensaios cujos objetivos foram inferir um possível mecanismo de ação inflamatória da fração.

Baseado no fato de que o padrão de permeabilidade vascular do tipo resposta imediata transitória aparece entre 10 e 30 minutos após estímulo inflamogênico pela liberação de mediadores químicos como a histamina, serotonina e bradicinina (BECHARA; SZABÓ, 2006), ensaios com anti-inflamatórios anti-histamínicos foram realizados a fim de verificar se DLPp pode atuar ou não causando um edema histaminérgico. Para isso foi utilizado Cloridrato de Prometazina, um anti-histamínico que antagoniza efeitos centrais e periféricos de histamina mediada por receptores do tipo H1. Este está relacionado à diminuição da permeabilidade capilar, formação de edema e prurido, os quais são característicos da ação de histamina nos receptores H1. Mais especificamente, o fármaco bloqueia o sítio de ligação do receptor H1, evitando a atividade da histamina a nível celular (CANTISANI et al., 2013). Os dados obtidos evidenciam uma tendência de redução do edema induzido por DLPp, indicando que a via pela qual o edema está sendo formado pode estar relacionada a moléculas da fração DLPp que têm afinidade pelos receptores histamínicos do tipo H1.

Além disso, foi investigado se houve produção de radicais livres no processo inflamatório induzido por DLPp por meio da determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD). Esta enzima é considerada um marcador molecular indireto de estresse oxidativo tecidual, pois degrada espécies reativas de oxigênio e aumenta a permeabilidade vascular devido a lesão de células (MITTLER, 2002; BECHARA; SZABÓ, 2006; NIU et al., 2015). Foi observado que SOD não apresentou sua atividade alterada durante o processo inflamatório induzido por DLPp. Esse dado corrobora com o fato de que não houve inflamação mediada por células no efeito pró-inflamatório de DLPp uma vez que o estresse oxidativo gerado pela inflamação está relacionado à migração de células fagocíticas ativadas, as quais liberam uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, superóxidos (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007).

Objetivando avançar na caracterização bioquímica da fração DLPp no que diz respeito a identificação de moléculas que poderiam estar envolvidas com o efeito pró-inflamatório observado, DLPp foi avaliada quanto a presença de proteínas/peptídeos e quanto a presença de moléculas semelhantes à histamina. A dosagem de proteínas solúveis pelo método de Bradford mostra pioneiramente que



existem moléculas de natureza proteica na fração estudada. No entanto, sua concentração é baixa e menor do que a observada na fração PLPp, a qual possui um valor de 650 µg/mL (FERNANDES, 2014), enquanto DLPp possui um valor quase dez vezes menor (69 µg/mL).

A análise do perfil de proteínas através de eletroforese para investigação de peptídeos permitiu a visualização de compostos de natureza proteica com baixa massa molecular inferior a 8 kDa em DLPp. Esse resultado revela a presença de possíveis peptídeos na fração DLPp, os quais podem estar envolvidos na indução do efeito pró-inflamatório observado. A literatura aponta a identificação de peptídeos de origem laticífera como é o caso de Alencar et al. (2006) que mostram a presença de peptídeos na fração dialisável do látex de *C. procera* com ação pró-inflamatória no modelo de peritonite.

Apesar do látex de *P. pudica* ser rico em proteínas (FERNANDES, 2014) e o fato de que a hipersensibilidade ao látex de plantas em algumas pessoas se dá pela presença das proteínas (REIS, 1994; GOMES, 2006; CABAÑES et al., 2012), não seria possível dizer claramente, neste momento, que são proteínas/peptídeos as responsáveis pela formação do leve efeito edematogênico observado pela fração DLPp. Por outro lado, é importante destacar que compostos pró-inflamatórios, como aminas vasoativas, têm sido identificados em fluidos laticíferos de plantas (SHIVKAR; KUMAR, 2003). Dessa forma, a investigação da presença de moléculas semelhantes à histamina na fração DLPp foi realizada para elucidar se este tipo de molécula estaria presente em DLPp e associado ao efeito pró-inflamatório observado.

Os dados de quantificação de histamina em DLPp revelaram a presença desta molécula na fração. Foram observados em média 3,7 mg de histamina por grama de DLPp. A presença de histamina foi também vista no látex seco de *C. procera* com uma estimativa de 6,13 µg/g da fração alvo de estudo (SHIVKAR; KUMAR, 2003). Outras plantas, como a urtiga (*Urtica urens*) e uva-de-cão (*Tamus communis*), são descritas como produtoras de histamina e causadoras de efeitos pró-inflamatórios (SCHMIDT; MOULT, 1983; CZARNETZKI et al., 1990).

O efeito edematogênico causado pela histamina é visto devido seu potencial em provocar aumento da permeabilidade vascular, eritema e edema. Isso foi

demonstrado pela primeira vez em 1927 quando Thomas Lewis injetou histamina por via intracutânea em tecido dérmico (LEWIS, 1927). No entanto, este pode também variar conforme o modelo utilizado para o ensaio, como por exemplo, a potência de inflamabilidade da histamina é maior em coelhos do que em ratos (LEME, 1981). Considerando que somente o grupo DLPP 300µg/pata foi estatisticamente significativo para o efeito edematogênico, é possível estimar que a quantidade de histamina injetada na pata do animal foi de 1,13 µg/pata. Sugere-se, dessa forma, que a fração DLPP do látex de *P. pudica* contém uma quantidade de histamina suficiente para desencadear um efeito pró-inflamatório significativo e, ao mesmo tempo, não duradouro.

Em relação à atividade anti-inflamatória de PLPP contra o edema de pata induzido por DLPP, é possível sugerir que tal atividade pode estar envolvida com a inibição da ação de histamina por parte de PLPP. Esse resultado corrobora com o estudo de Fernandes e colaboradores (2015), em que foi verificado a capacidade de PLPP inibir a formação do edema na pata dos animais induzido pela administração intraplantar de histamina. Este achado é bastante interessante, uma vez que revela a presença das atividades antagonistas (anti e pró-inflamatórias) no látex de *P. pudica* e o fato de que a fração com ação anti-inflamatória é capaz de reverter a inflamação induzida pela fração pró-inflamatória.

Em adição, os dados demonstraram que PLPP não foi capaz de induzir evento pró-inflamatório quando administrado por via intraplantar nos animais. Estudo anterior demonstrou que a administração de PLPP na cavidade peritoneal de camundongos durante 10 ou 20 dias consecutivos, mostrou não alterar significativamente os níveis de parâmetros inflamatórios no fígado, rins e baço de animais (SOUZA, 2018), evidenciando que PLPP está estreitamente relacionada a redução da inflamação e não com sua indução.

Por fim, a análise da capacidade de DLPP inibir o evento inflamatório induzido por carragenina foi investigado. O tratamento dos animais com diferentes concentrações de DLPP não foi capaz de inibir o efeito edematogênico induzido pelo agente inflamatório. Estudo realizado por Brito (2018) revelou que DLPP apresenta atividade antioxidante promovida por flavonoides, moléculas descritas por apresentarem ação anti-inflamatória (RAUF et al., 2016; FAN et al., 2018). A não

observação de efeito pode estar relacionada ao baixo teor de flavonoides nessa fração, o qual é de 1,22 miligrama equivalente de quercetina por grama de DLPP ou à ausência de tal atividade por este grupo de molécula presente no látex de *P. pudica*.

## 7 CONCLUSÕES

O estudo realizado permite concluir que as propriedades pró- e anti-inflamatória coexistem no látex de *P. pudica*, podendo estas serem separadas por meio de etapas de centrifugação e diálise.

Dentre as duas frações obtidas, a fração DLPp foi aquela que apresentou atividade pró-inflamatória ao passo que não apresenta propriedades anti-inflamatórias. A inflamação promovida por DLPp parece não envolver o recrutamento de células de defesa. Dessa forma, sugere-se que DLPp pode atuar exclusivamente na fase vascular da inflamação. No que se refere a sua composição, é notável a presença de peptídeos e histamina, os quais parecem estar envolvidas com o efeito pró-inflamatório promovido por DLPp. No entanto, é necessário investigação mais aprofundada para sua confirmação.

A fração PLPp, detentora de ação anti-inflamatória, não induz efeito pró-inflamatório quando administrada por via intraplantar em camundongos. Apresenta tendência de efeito anti-inflamatório frente ao edema induzido por DLPp, evento esse provavelmente relacionado à presença de proteínas que possam atuar bloqueando receptores de histamina.

Este é o primeiro relato que mostra a presença concomitante de duas atividades distintas do látex de *P. pudica* em modelo de edema de pata, evidenciando que a fração de baixa massa molecular (< 8 kDa) é inflamógena ao passo que sua fração de alta massa molecular (> 8 kDa) reduz a inflamação induzida pela primeira.

Tendo em vista a atividade pró-inflamatória que o látex de *P. pudica* pode desencadear, esses dados podem ajudar a projetar novas alternativas para tratar as reações inflamatórias locais características da exposição ao látex produzido por *Plumeria pudica*, norteando para um possível tratamento que neutralize a reação. Além disso, a fração DLPp é vista como uma potencial fonte de moléculas inflamógenas, a partir da qual modelos de inflamação podem ser desenvolvidos, bem como servir de base para estudos de moléculas imunoestimuladoras.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, AK *et al.* Reparo tecidual: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Robbins, Patologia Básica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p.63-186.

ADIWILAGA, K.; KUSH, A. Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant molecular biology**, v. 30, n. 5, p. 935-946, 1996.

ALBUQUERQUE, T. M. *et al.* Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 15-23, 2009.

ALENCAR, N. M. N. *et al.* 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. *et al.* Pro and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, v. 55, p. 1–6, 2006.

ANDRADE, B. A. B. de. Inflamação e reparação. In: ALMEIDA, O. P. de. **Patologia oral**. São Paulo: Artes Médicas, 2016, p. 9-15.

ARCHER, B. L. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. **Biochemical Journal**, v. 75, n. 2, p. 236, 1960.

ARRUDA, M. F. C. *et al.* Microbial activity and toxicity of *Euphorbia tirucalli* L.(aveloz) latex. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 4, p. 492-497, 2015.

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

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

AZARKAN, M. *et al.* *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1319-1325, 1997.

AZIZ, A. *et al.* Dermatological Evaluation of Anti-Irritant and Anti-Inflammatory Effect of Plumerin-R Isolated from the Latex of *Plumeria rubra* Linn. **Latin American Journal Of Pharmacy**, v. 37, n. 2, p. 317-320, 2018.

BAUER, G. *et al.* Investigating the rheological properties of native plant látex. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, p. 1–6, 2013.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J. PROCESSO INFLAMATÓRIO - Alterações Vasculares e Mediação Química. UNESP, 2006. Disponível em: <[http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam\\_aspectosvasculares2006.pdf](http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf)> Acesso em: 17 nov. 2018.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Mast cells in autoimmune disease. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 875, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRITO, F. C. de. **Caracterização fitoquímica, atividade antioxidante e antimicrobiana da fração dialisável do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2018.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

CABAÑES, N. *et al.* 1 Latex Allergy: Position Paper. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 22, n. 5, p. 313, 2012.

CANABRAVA, L. C. M. N.; OLIVEIRA, F. de; CANABRAVA, H. A. N. Avaliação da resposta hiperalgésica e edematogênica induzida por bmtx: uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. **Horizonte Científico**, v. 2, n. 1, 2008.

CANTISANI, C. et al. Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

CARDOZO, M. et al. Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 149-168, 2013.

CHANDA, I. et al. A protease isolated from the latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 1: purification and characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 6, p. 705-711, 2011.

CHAVAN, B. A.; HUNDIWALE, J. C.; PATIL, A. V. Plant latex: an inherent spring of pharmaceuticals. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 04, p. 1781-1796, 2015.

CHAVAKIS, E.; CHOI, E.Y.; CHAVAKIS, T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 191–197, 2009.

CHEYE, M.L.; CHEUNG, K. Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* 29, 397-402, 1995.

COSTA, L. S. **Estudo do uso do aveloz (*Euphorbia tirucalli*) no tratamento de doenças humanas: uma revisão**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G. B. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 37, pp. 201-204, 2000.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 23, p. 297-298, 1971.

DWIVEDI, S.; SHRIWAS, S.; DUBEY, R. Traditional phytotherapy among tribal and local villages of Madhya Pradesh, India used in the treatment of Gynecological Disorders. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 8, n. 11, 2017.

ERDAG, D.; MERHAN, O.; YILDIZ, B. Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. *In*: **Biogenic Amines**. IntechOpen, 2018.

FAHN, A. Secretory Tissues in Plants. London: Academic Press, 1979. 302p.

FAN, X. et al. Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Effect of Luteolin in Mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 37, n. 4, 2018.

FERNANDES, H. B. *et al.* Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 269-277, 2015.

FERNANDES, H. de B. **Caracterização bioquímica de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) e seu potencial antiinflamatório e antinociceptivo**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2014.

FIALKOW, Lea; WANG, Yingchun; DOWNEY, Gregory P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 153-164, 2007.

FLEMMIG, M. *et al.* Isolation and Characterization of Mauritanicain, a Serine Protease from the Latex of *Euphorbia mauritanica* L. **Planta medica**, v. 234, n. 06, p. 551-556, 2017.

FREITAS, C. D. T. *et al.* Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 10-11, p. 781-789, 2007.



FREITAS, C. D. T. *et al.* First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 361-371, 2016.

FU, H. Y. *et al.* Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain-inducing toxins in the stinging hairs of the nettle, *Urtica thunbergiana*. **Annals of botany**, v. 98, n. 1, p. 57-65, 2006.

GALLI, S. J.; WEDEMEYER, J.; TSAI, M. Analyzing the roles of mast cells and basophils in host defense and other biological responses. **International journal of hematology**, v. 75, n. 4, p. 363, 2002.

GEBREMESKEL, L. *et al.* *In Vivo* Wound Healing and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Latex of *Aloe megalacantha* Baker (Xanthorrhoeaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1-7, 2018.

GERACI, A.; POLIZZANO, V.; SCHICCHI, R. Ethnobotanical uses of wild taxa as galactagogues in Sicily (Italy). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 87, n. 2, 2018.

GHANDEHARI, F.; FATEMI, M. The effect of *Ficus carica* latex on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast cancer in rats. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 286, 2018.

GILFILLAN, A. M.; METCALFE, D. **Mast cell biology: contemporary and emerging topics**. Springer Science & Business Media, 2011.

GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa* pith. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1473-1475, 1993.

GOMES, M. J. Hipersensibilidade ao látex. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v.8, n.2, p. 66-72, 2006.

GREVE, H.H. Rubber, 2. Natural. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. p. 583-594.

HAGEL, J.M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? The secret of life of laticifers. **Trends in Plant Sciences**, v.12, p.631-639, 2008.

HART, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. **Journal of wound care**, v. 11, n. 6, p. 205-209, 2002.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, A. B. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax. **Journal of ethnopharmacology**, v. 204, p. 1-7, 2017.

HILL, S. J. *et al.* International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 3, p. 253-278, 1997.

HUI, Y. H.; SHERKAT, F. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering-4 Volume Set**. CRC press, 2005.

INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 2021.

JANNATIN, M.; SUPRIYANTO, G.; PUDJIASTUTI, P. A novel spectrophotometric method for determination of histamine based on its complex reaction with Cu (II) and Alizarin Red S. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 52, n. 6, p. 1045-1050, 2017.

JANSSEN, W. J.; HENSON, P. M. Cellular regulation of the inflammatory response. **Toxicologic pathology**, v. 40, n. 2, p. 166-173, 2012.

JOGDAND, V.; DHABE, A. *Plumeria pudica* Jacq.(Apocynaceae): an addition to the exotic plants of marathwada. **BIOINFOLET**, v. 10, n. 2, p. 356, 2013.

JUCÁ, T. L. *et al.* Aspectos etnobotânicos e potencial farmacológico de plantas laticíferas localizadas no sítio São Vicente, município de Santana do Matos, Rio Grande do Norte. **Revista Extensão & Sociedade**, v. 8, n. 2, p. 49-58, 2018.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Histamine in chronic allergic responses. **J Invest Allergol Clin Immunol**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2005.

KAWAHARA, K. *et al.* Prostaglandin E 2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KOBAYASHI, H., ISHIZUKA, T., OKAYANA, Y., 2000. Human mast cells and basophils as sources of cytokines. **Clin. Exp. Allergy**. 30 (9), 1205 – 1212

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

KULINSKY, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry**, v. 72, p. 595-607. 2007.

KUMAR, V. L. *et al.* Protective effect of proteins derived from *Calotropis procera* latex against acute inflammation in rat. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 35, n. 1-2, p. 1-8, 2015.

KUMAR, V. L.; ROY, S. Protective effect of latex of *Calotropis procera* in Freund's Complete Adjuvant induced monoarthritis. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 1, p. 1-5, 2009.

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

KUSTER, V. C. *et al.* Glandular trichomes and laticifers in leaves of *Ipomoea pes-caprae* and *I. imperati* (Convolvulaceae) from coastal Restinga formation: Structure and histochemistry. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1117-1125, 2016.

LADERO, V. *et al.* Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.

LEME, J. G. Participação da histamina em processos fisiopatológicos. **Arquivos Médicos do ABC**, v. 4, n. 2, 1981.

LEMOS, F. *et al.* Cysteine Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) Inhibit Melanoma Metastasis and Modulate Expression of Proteins Related to Proliferation, Migration and Differentiation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 2846, 2018.

LEWINSOHN, T. M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, v. 2, n. 1, p. 64-68, 1991.

LEWIS, T. **The Blood Vessels of the Human Skin and their Responses**. London: Shaw and Sons, 1927.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; MYRON, I.; NOURSHARGH, C.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Publishing Group**, v. 7, p. 678-698, 2007.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p. S232–S240, 2006.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v. 26, n. 4, p. 939-944, 1987.

MAINTZ, L.; NOVAK, Natalija. Histamine and histamine intolerance. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1185-1196, 2007.

MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation: I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: An electron microscopic study. **The Journal of Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 571-605, 1961.

MALEK, K. *et al.* Cysteine Proteases from *Carica papaya*: An important enzyme group of many industrial applications. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 11, n. 2, p. 11-16, 2016.

MALI, P. Y.; PANCHAL, S. S. *Euphorbia tirucalli* L.: Review on morphology, medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 603-613, 2017.

MARINHO, D. G. *et al.* The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 530-537, 2011.

MAZOIR, N. *et al.* Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1328-1338, 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428, 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MOON, J. M.; LEE, B. K.; CHUN, B. J. Toxicities of raw *Alocasia odora*. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1720-1723, 2011.

MURPHY, H. S.; WARD, P. A. Inflamaç o. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. Rubin, **Patologia: bases cl nicopatol gicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.43-85.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: Hemoglobinopatias, Prote nas S ricas, Lipoprote nas e DNA**. S o Paulo: Editora Santos, 2010.

NAWROT, R. Defense-related Proteins from *Chelidonium majus* L. as Important Components of its Latex. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 8, p. 864-880, 2017.

NIU, X. *et al.* Protective effect of cavidine on acetic acid-induced murine colitis via regulating antioxidant, cytokine profile and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 5, p. 34-45, 2015.

OLIVEIRA, H. P. *et al.* A novel peroxidase purified from *Marsdenia megalantha* latex inhibits phytopathogenic fungi mediated by cell membrane permeabilization. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 743-753, 2017.

OLIVEIRA, J. S. de. **Caracterização bioquímica e atividade citotóxica *in vitro* e antitumoral *in vivo* de proteínas do látex de *Calotropis procera***. 2011. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Ceará - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, J. S. de. **Múltiplas proteínas estão envolvidas nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva do látex da planta medicinal *Calotropis procera* (AIT.) R. Br.** 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, N. V. de M. **Efeito protetor de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) na colite induzida por ácido acético**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2018.

OLIVEIRA, L. E. S. **Avaliação do efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) na periodontite induzida por ligadura em ratos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2019.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381, 2011.

QUEIROZ, I. N. L. **Caracterização estrutural preliminar e efeitos na inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides***. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

RAMOS, M. V. *et al.* A phytopathogenic cysteine peptidase from latex of wild rubber vine *Cryptostegia grandiflora*. **The protein journal**, v. 33, n. 2, p. 199-209, 2014.

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

RAMOS, M. V. *et al.* Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 3, p. 387-392, 2009.

RAMOS, M. V. *et al.* Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. **Trends in plant science**, 2019.

RANGEL, T.B.A. *et al.* Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl, **Biochimie**, v. 94, p. 525-532, 2012.

RAUF, A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. **Complementary therapies in medicine**, v. 25, p. 132-138, 2016.

REIS, J. G. Latex sensitivity. **AORN journal**, v. 59, n. 3, p. 615-621, 1994.

ROGERIO, A. P. *et al.* Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795-804, 2007.

SABANDAR, C. W. *et al.* Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SALEEM, U. *et al.* Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 322-328, 2015.

SALIM, M. N. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* Linn. latex in cream formulation on CD68 expression in mice skin wound. **Veterinary world**, v. 11, n. 2, p. 99, 2018.

SANTANA, L. de A. B. *et al.* Antidiarrheal effects of water-soluble proteins from *Plumeria pudica* latex in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1147-1154, 2018.

SANTANA, L. de A. B. **Avaliação da atividade antidiarreica de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

SANTOS, T. O. B.; LISBOA, C. M. C. A.; CARVALHO, F. G. Análise da arborização viária do bairro de Petrópolis, Natal, RN: uma abordagem para diagnóstico e planejamento da flora urbana. **Revsbau**, v.7, n.4, p.90-106, 2012.

SANTOS JUNIOR, J. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista brasileira de coloproctologia**, v. 23, p. 206-210, 2003.

SCHMIDT, R. J.; MOULT, S. P. The dermatitic properties of black bryony (*Tamus communis* L.). **Contact Dermatitis**, v. 9, n. 5, p. 390-396, 1983.

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

SEIGLER, D. S. Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 380-401, 1994.

SERHAM, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p. 349-361, 2008.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food research international**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SHARMA, A.; KUMARI, M.; JAGANNADHAM, M. V. Benghalensin, a highly stable serine protease from the latex of medicinal plant *Ficus benghalensis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 23, p. 11120-11126, 2009.

SHINDE, P. R.; PATIL, P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological Review of *Plumeria* species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 217–227, 2014.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Effect of anti-inflammatory drugs on pleurisy induced by latex of *Calotropis procera* in rats. **Pharmacological research**, v. 50, n. 3, p. 335-340, 2004.



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

SHUKLA, A.; GUNDAMPATI, R. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical and biophysical characterization of a peroxidase isolated from *Euphorbia tirucalli* with antifungal activity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 5, p. 236-248, 2016.

SINGH, H. *et al.* Inflammation induced by latex of *Calotropis procera*—a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 43, n. 3, p. 219-224, 2000.

SOARES, P. M. *et al.* Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 125-129, 2005.

SOUALMIA, Feryel; EL AMRI, Chahrazade. Serine protease inhibitors to treat inflammation: a patent review (2011-2016). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 28, n. 2, p. 93-110, 2018.

SONIS, S. T. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. **Cancer**, v. 100, n. S9, p. 1995-2025, 2004.

SOUZA, B. da S. **Avaliação toxicológica das proteínas do látex da *Plumeria pudica* em modelo de camundongos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2018.

SOUZA, D. P. *et al.* Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, v. 234, n. 1, p. 183-193, 2011.

SPINOSA, H. de S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SRITANYARAT, W. *et al.* Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, p. 1644-1650, 2006.

SUAREZ, S. N. *et al.* First confirmed report of powdery mildew (*Erysiphe* sp.) on *Plumeria pudica* in the United States. **New Disease Reports**, v. 36, p. 3-3, 2017.

TEIXEIRA, C. F. P. *et al.* Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v.42, p.947–62, 2003.

THANGAM, E. B. *et al.* The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1873, 2018.

TOFANELLI, E. J.; SILVA, F. A. Propriedades fitoterápicas de *Euphorbia tirucalli* L.: da etnobotânica a farmacognosia. **BIOFAR**, v. 6, n. 1, 2011.

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-264, 1991.

VIANA, C. A. *et al.* Cytotoxicity against tumor cell lines and anti-inflammatory properties of chitinases from *Calotropis procera* latex. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 10, p. 1005-1013, 2017.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WOOLLEY, D. E. The mast cell in inflammatory arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 17, p. 1709-1711, 2003.

WOLOSKI, J. R.; BURMAN, D.; ADEBONA, O. Mite and Bed Bug Infections. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 409-421, 2018.

WONG, S. K.; LIM, Y. Y.; CHAN, E. W.C. Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. **Pharmacognosy Communications**, v. 3, n. 3, p. 2, 2013.

YAGAMI, T. *et al.* Plant defense-related enzymes as latex antigens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 379–85, 1998.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil Adhesion and Activation under Flow.  
**Microcirculation**, v. 16, p. 31-42, 2009.

## ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550  
Telefone: (86) 3215-5734, e-mail: ceap@ufpi.edu.br



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Látex da planta Plumeria pudica Jacq.: Caracterização, identificação e estudos aplicados de proteínas*", registrada nº 318/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA do Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **30/06/2017**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Agosto/ 2017 à Julho/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/swiss
Nº de Animais	138
Peso/ Idade	25-30g/ 45 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 30 de Junho de 2017.

pp Waldilene Ribeiro de Araújo Lima  
 Profa. Dra. Ivete Lopes de Mondim  
 Coordenadora da CEUA/UFPI