



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

BRUNA DA SILVA SOUZA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DA *Plumeria
pudica* EM MODELO DE CAMUNDONGOS**

**PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO-2018**

BRUNA DA SILVA SOUZA

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DA *Plumeria pudica* EM MODELO DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Novas Tecnologias e Metodologias de Diagnóstico e Tratamento

Orientador: Prof. Dr Jefferson Soares de Oliveira

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

S729a Souza, Bruna da Silva.

Avaliação toxicológica das proteínas do látex da *Plumeria pudica* em modelo de camundongos [manuscrito] / Bruna da Silva Souza. – 2018.

72 f. : il.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

Área de concentração: Novas Tecnologias e Metodologias de Diagnóstico e Tratamento.

1. Apocynaceae. 2. Toxicidade. 3. Estresse Oxidativo. 4. Histopatologia. II. Oliveira, Jefferson Soares de. I. Título.

CDD: 615

BRUNA DA SILVA SOUZA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DA *Plumeria
pudica* EM MODELO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí

Professor Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Universidade Federal do Piauí
(Orientador)

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO 2018

À Deus, que me concede a coragem, força e a sabedoria necessária para seguir em frente.

Aos meus pais Ilma e Osmar que sempre acreditaram em mim, e que me deram todo suporte para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me conceder o dom da vida. Por me dar forças para vencer minhas dificuldades e sabedoria para enfrentar os momentos difíceis.

Aos membros da minha família pelo amor o qual fui criada e por todos os ensinamentos de dignidade, honestidade e verdade que me acompanham. Aos meus pais, **Ilma e Osmar** pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim e nos meus sonhos. E por não medirem esforços na tentativa de me ajudar a realizá-los. Às tias **Ida e Iraneide**, pelo carinho, apoio e o incentivo que sempre me deram. A avó **Iracema** pelo apoio, conselhos e o carinho sempre demonstrado. Ao tio **José** (*in memorian*), pelo carinho e cuidado que nunca esquecerei. A **Geórgia e Ilanna**, pelo companheirismo e incentivo inigualável. Agradeço a todos por ter torcido pelo meu sucesso durante todos esses anos.

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira**, meu especial agradecimento, por ter aceitado assumir minha orientação neste mestrado e pelo constante apoio, compreensão e confiança no meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos não apenas limitados à pesquisa, mas pelos conselhos e experiências que irei levar para a vida toda. Além da oportunidade de crescimento profissional e pela convivência desde o período de iniciação científica na época da graduação.

À **Profa. Dra. Karina de Oliveira Drumond**, pela tranquilidade e atenção que sempre demonstrou desde a graduação e por ter aceitado prontamente o convite para participar da banca examinadora colaborando com a sua riqueza científica.

Ao **Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos**, pela atenção e disponibilidade. Pela importante colaboração nos exames histopatológicos e por gentilmente ter aceitado o convite para participar da banca examinadora colaborando com a sua riqueza científica.

À **Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus**, por ter aceitado prontamente o convite para participar da banca examinadora colaborando com a sua riqueza científica.

Aos **professores** do Programa de Pós- Graduação em Ciências Biomédicas, pelos ensinamentos.

Aos meus fiéis companheiros de laboratório **Naylla V. Moraes, Lucas A. Moita, Lucas Eduardo S. Oliveira e Felipe C. de Brito** pela ajuda crucial e companheirismo

durante essa jornada. Pelos conselhos e por dividirem os momentos felizes e de angústia. Agradeço pela amizade sincera construída dia a dia.

À **Ana Clara Sales, Mayck Barbosa, Jhoana Darc Lopes, Dayane Soares e Gabriela Linhares** pelo o auxílio nos experimentos, na etapa final deste trabalho.

Ao **BIOMIC**, laboratório onde realizei parte dos meus experimentos, e aos demais integrantes deste laboratório de pesquisa. Em especial a Emanuella Lima (Manu) por estar sempre disposta a ajudar.

Ao **LAFEX**. Em especial a Francisca Beatriz Melo Sousa, pela paciência e ajuda na realização dos experimentos.

Aos colegas do **LAPHIS**, pela ajuda na realização dos experimentos e pelos bons momentos compartilhados. Em especial, para Larissa dos Santos Pessoa, Felipe Rodolfo Pereira da Silva e Luiz Felipe de Carvalho França pelo apoio, colaboração e disponibilidade. E claro, pela amizade cultivada.

Aos amigos de longa data (**bês**), agradeço pelo carinho e apoio durante esses vários anos de amizade. E principalmente pela compreensão, todas às vezes que não pude comparecer as nossas reuniões. Sei que estão sempre torcendo por mim e orgulhosos das minhas conquistas.

Às minhas queridas **Mayrla Sales (teacher), Leidiane Carvalho e Ana Luiza Oliveira** pelo companheirismo e generosidade sempre demonstrados. Agradeço por compreenderem todas às vezes que precisei me ausentar das aulas e remarcar nossas atividades devido algum experimento. E principalmente por torcerem pelo meu sucesso de forma tão sincera.

Aos meus amigos **Ana Patrícia Oliveira, Simone Araújo, Renata Paiva, Mariana Araújo, Maria Eletícia Sousa e Cleison Bruno Machado**, agradeço por me ouvirem sempre que precisei falar e pelo incentivo para lutar pelos meus sonhos. Agradeço pela amizade construída nesses vários anos.

A **Universidade Federal do Piauí** e o **Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas**.

Às agências de fomento **CAPES** e **FAPEPI** pelo auxílio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DA *Plumeria pudica* EM MODELO DE CAMUNDONGOS

Muitos são os relatos sobre diferentes efeitos farmacológicos promovidos por moléculas obtidas a partir do látex de várias plantas, como é o caso da *Plumeria pudica*. As proteínas presentes em seu látex foram relacionadas às suas propriedades anti-inflamatória, anti-nociceptiva e antidiarreica. Considerando os resultados relevantes já apresentados pelo látex de *P. pudica* esse trabalho, teve como finalidade avaliar os aspectos toxicológicos do tratamento agudo e subcrônico de camundongos com as proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp). Os ensaios de toxicidade foram realizados com camundongos Swiss (n=24) que receberam uma dose diária de 40 mg/kg de PLPp ou solução salina 0,9% intraperitoneal (i.p.) por 10 e 20 dias consecutivos, referentes ao período de avaliação da toxicidade aguda e subcrônica, respectivamente. Foram avaliados o perfil comportamental, hematológico, bioquímico e histopatológico desses animais. Para determinação da DL50 os camundongos (n=6) receberam uma dose única de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg e foram observados quanto a presença de sinais clínicos ou morte dos mesmos, durante 14 dias após a administração. Adicionalmente uma análise proteômica da fração proteica PLPp foi realizada utilizando espectrometria de massas objetivando a identificação de proteínas presentes na amostra. Não foram observadas alterações significativas no peso corporal e peso dos órgãos dos animais tratados com PLPp durante avaliação aguda e subcrônica. A contagem total e diferencial de leucócitos não apresentou diferença significativa entre os grupos. Observou-se aumento significativo de AST no grupo tratado com PLPp para a toxicidade aguda. Não houve diferença significativa nas medidas de ALT, creatinina e ureia entre o tratamento com solução salina e PLPp para os dois períodos de avaliação. Em relação ao exame histopatológico, observaram-se discretas alterações como leve congestão no rim e baço dos animais para a avaliação aguda e subcrônica respectivamente. O nível de GSH no rim foi significativamente maior em animais tratados com PLPp no ensaio de toxicidade aguda, porém não foram observadas diferenças para a avaliação subcrônica. Os níveis de MDA e MPO no fígado, baço e rim não apresentaram diferença significativa. A fração PLPp não se mostrou letal nas doses de 300 e 2000 mg/kg, sendo a DL50 definida como de classe 5 (faixa de 2000-5000mg/kg). Porém, os animais tratados com estas doses apresentaram alguns sinais de toxicidade como diminuição da atividade geral, dificuldade de locomoção, redução da resposta aos reflexos auricular e corneal, e a estímulos como toque, aperto de cauda e ao reflexo de endireitamento. Além de apresentarem irritabilidade, ptose, piloereção, hipotermia e respiração ofegante. Esses sinais foram observados nas primeiras horas após a administração, no entanto, a maioria não persistiu mais que 24h. A análise de PLPp por espectrometria de massas revelou a presença de proteases cisteínicas, quitinases e outras proteínas comumente encontradas em fluidos laticíferos. A fração PLPp quando administrada por via intraperitoneal apresentou baixa toxicidade. Porém mais estudos devem ser realizados para o estabelecimento do seu uso seguro.

Palavras-Chave: Apocynaceae, Toxicidade, Estresse Oxidativo, Histopatologia.

ABSTRACT

TITLE: TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF LATEX PROTEINS OF *Plumeria pudica* IN MICE

There are many reports on different pharmacological effects promoted by molecules obtained from the latex of several plants, as it is the case of *Plumeria pudica*. The proteins present in its latex were related to its anti-inflammatory, anti-nociceptive and antidiarrheal properties. Considering the relevant results already presented by the latex of *P. pudica*, this study aimed to evaluate the toxicological aspects of the acute and subchronic treatment on mice with the latex protein of *Plumeria pudica* latex (PLPp). Toxicity assays were performed with Swiss mice (n = 24) which received a daily dose of 40 mg/kg PLPp or 0.9% intraperitoneal (ip) saline solution for 10 or 20 consecutive days, referring to the assessment period of acute and subchronic toxicity, respectively. The behavioral, hematological, biochemical and histopathological profile of these animals were evaluated. For determination of LD50 the mice (n = 6) received a single dose of 300 mg / kg or 2000 mg / kg and were observed for clinical signs or their death for 14 days after administration. Additionally a proteomic analysis of the PLPp protein fraction was performed using mass spectrometry aiming the identification of proteins present in the sample. No significant changes were observed in body weight and in organs of these animals treated with PLPp during the acute and subchronic ass. The total and differential leukocyte counts did not present significant difference among the groups. A significant increase of AST in the group treated with PLPp for acute toxicity was observed. There wasn't significant difference in ALT, creatinine and urea measurements between treatment with saline and PLPp for the two assessment periods. Regarding the histopathological examination, discrete alterations such as congestion in the kidney and spleen of these animals were observed for the acute and subchronic assessment, respectively. The level of GSH in the kidney was significantly higher in animals treated with PLPp in the acute toxicity test, but no differences were observed for the subchronic assessment. The levels of MDA and MPO in the liver, spleen and kidney didn't present significant difference. The PLPp fraction didn't appear to be lethal at doses of 300 and 2000 mg / kg, and the LD50 being defined as class 5 (range of 2000-5000mg / kg). However, the animals treated with these doses showed some signs of toxicity such as decreasing of general activity, difficulty in locomotion, reduced response to auricular and corneal reflexes, and to stimuli such as touch, tail tightening and righting reflex. In addition, they presented irritability, ptosis, piloerection, hypothermia and accelerated breathing. These signs were observed in the first few hours after administration and but most of them did not persist for more than the most part to 24 hours. These signs were observed in the first few hours after administration but most of them did not persist for more than 24 hours. The PLPp analysis by mass spectrometry revealed the presence of cysteine proteases, chitinases and other proteins commonly found in laticiferous fluids. The PLPp fraction when administered intraperitoneally presents low toxicity. Further studies should be performed to establish its safe use.

Key words: Apocynaceae, Toxicity, Oxidative Stress, Histopathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Planta <i>Plumeria pudica</i> e seu aspecto geral11
Figura 2	Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg, empregando-se três animais de um único sexo por etapa.....26
Figura 3	Evolução ponderal dos camundongos tratados com Proteínas do Látex de <i>Plumeria pudica</i> na toxicidade aguda e subcrônica.....27
Figura 4	Análise histopatológica de órgãos vitais: (A) fígado, rim (B) e baço (C) dos camundongos tratados com 40 mg/kg de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> , durante 10 dias referentes ao ensaio de toxicidade aguda.....32
Figura 5	Análise Histopatológica de órgãos vitais: (A) fígado, rim (B) e baço (C) dos camundongos tratados com 40 mg/kg de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> durante 20 dias referentes ao ensaio de toxicidade subcrônica.....33
Figura 6	Efeitos de PLPp sobre o índice antioxidante glutaciona reduzida (GSH) em fígado e rim de animais submetidos a testes de toxicidade aguda (A) e subcrônica (B) utilizando proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i>34
Figura 7	Efeitos de PLPp sobre o marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) em fígado, baço e rim de animais submetidos a testes de toxicidade aguda (A) e subcrônica (B) utilizando proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i>35
Figura 8	Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) em fígado, baço e rim de animais submetidos a testes de toxicidade aguda (A) e subcrônica (B) utilizando proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i>36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contagem total e diferencial de leucócitos dos camundongos tratados com Proteínas do Látex de <i>Plumeria pudica</i> na toxicidade aguda e subcrônica.....	29
Tabela 2	Parâmetros Bioquímicos dos camundongos tratados com Proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> na toxicidade aguda e subcrônica.....	29
Tabela 3	Peso relativo dos órgãos (fígado, baço e rins) dos camundongos tratados com proteínas do Látex de <i>Plumeria pudica</i> avaliados para toxicidade aguda e subcrônica.....	31
Tabela 4	Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas (300 e 2000 mg/kg) de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> em camundongos.....	38
Tabela 5	Lista de Proteínas identificadas no látex de <i>Plumeria pudica</i> por espectrometria de massa.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

ANOVA: Análise de variância

AST: Aspartato aminotransaminase

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

DTNB: 5,5 Ditidio-bis-ácido-2-nitrobenzóico

E.P.M.: Erro padrão da média

EROs: Espécies reativas do oxigênio

HTAB: Tampão de brometo de hexadecilmetilamônio

GHS: Sistema Globalmente Harmonizado

GSH: Glutathiona

i.p.: Intraperitoneal

MDA: Malondialdeído

MPO: Mieloperoxidase

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PLPp: Proteínas do látex de *Plumeria pudica*

Sal: Salina

TCA: Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 PLANTAS LATICÍFERAS E O LÁTEX	4
2.1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LÁTEX	5
2.1.3 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO LÁTEX VEGETAL.....	8
2.2 O GÊNERO <i>Plumeria</i> L. E A ESPÉCIE <i>Plumeria pudica</i> (JACQ., 1760)	9
2.2.1 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO GÊNERO <i>Plumeria</i>	11
2.3 PLANTAS MEDICINAIS E TOXICIDADE	13
2.4 TOXICOLOGIA PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS	15
3 OBJETIVOS	19
3.1 GERAL	19
3.2 ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL.....	20
4.1.1 Coleta e processamento do látex	20
4.2 ESTUDO DO PERFIL TOXICOLÓGICO	20
4.2.1 Animais	20
4.2.2 Avaliação da toxicidade aguda.....	20
4.2.3 Avaliação da toxicidade subcrônica.....	21
4.2.4 Avaliação ponderal.....	21
4.2.5 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos	21
4.2.6 Exames bioquímicos séricos	22
4.2.7 Avaliação da massa dos órgãos	22
4.2.8 Avaliação histopatológica	22
4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE CELULAR E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	23
4.3.1 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)	23
4.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	24
4.3.3 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	24

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4.5 DL 50 MEDIANA.....	25
4.6 ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÁTEX DE <i>Plumeria pudica</i>	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 AVALIAÇÃO PONDERAL.....	27
5.2 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	27
5.3 EXAMES BIOQUÍMICOS SÉRICOS	28
5.4 AVALIAÇÃO DAS MASSAS DOS ÓRGÃOS.....	30
5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	30
5.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH)	34
5.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA)	35
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	36
5.9 DETERMINAÇÃO DA DL 50 MEDIANA	37
5.10 ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÁTEX DE <i>Plumeria pudica</i>	38
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	51
8 REFERÊNCIAS	52
ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	67
ANEXO II – PARÂMETROS DE SCREENING HIPOCRÁTICO UTILIZADOS NOS ENSAIOS TOXICOLÓGICOS (BRITO, 1994).....	68
ANEXO III – TABELA PARA AVALIAÇÃO DO SCREENING HIPOCRÁTICO	72

1 INTRODUÇÃO

O interesse científico nos ramos das Ciências Biomédicas especialmente em produtos provenientes de fontes naturais possibilitou o surgimento de diversas estratégias tecnológicas que variam desde o screening biológico, isolamento, até as triagens clínicas. Métodos os quais atualmente são considerados essenciais na descoberta de valores terapêuticos de uma ampla variedade de plantas (BIBI *et al.*, 2011, BONIFÁCIO, 2014; SPÓSITO, 2017).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades existente no planeta, possuindo cerca de 20-22% de todas as plantas e microrganismos existentes na Terra. Porém apenas cerca de 8% das espécies vegetais encontradas no país foram estudadas (CALIXTO *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2016). Diante desse fato e, principalmente devido a cultura do uso de plantas na medicina popular brasileira, as propriedades medicinais de diferentes espécies vegetais vêm sendo amplamente investigadas por pesquisadores brasileiros e pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (BRASIL, 2014).

Diversos estudos realizados têm demonstrado que o látex produzido por algumas espécies de plantas é uma fonte natural de compostos biologicamente ativos e de muitas enzimas proteolíticas responsáveis por diversos benefícios para a saúde. Por isso um amplo progresso em torno de sua caracterização e suas possíveis utilidades industriais e farmacêuticas tem sido observado (BINDHU & SINGH, 2014).

O Nordeste brasileiro é reconhecido por sua abundante biodiversidade, relacionada principalmente a plantas e habitats e por compreender desde a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, sistema de mangues e dunas costeiras, até florestas secas e savanas, além do seu principal ecossistema, a “caatinga” (AGRA *et al.*, 2007). Em relação ao látex de plantas encontrados na região Nordeste, investigações acerca de estruturas químicas identificadas, seguido de buscas por suas aplicações tem sido desenvolvido por diversos pesquisadores (FREITAS *et al.* 2007; 2011; JUCA *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2014). Tal iniciativa é apresentada na forma química de produtos naturais seguida de estudos em modelos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos em animais, órgãos e células os quais têm gerado um conhecimento da química funcional de espécies (MONTEIRO, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80 % da população mundial faz uso de terapias alternativas como formas de tratamento e as plantas medicinais são

os principais medicamentos utilizados (WHO, 2013). Embora façam uso de forma copiosa dessas plantas medicinais, apenas este fato não comprova a sua efetividade e nem a ausência de toxicidade, deste modo é fundamental o conhecimento da dose eficaz e aquela que produz toxicidade, revelando-se estritamente necessário o estudo farmacodinâmico e toxicológico padronizado (AGRA *et al.*, 2007; MARANHÃO, 2010).

A toxicidade de plantas medicinais é um problema considerado de saúde pública uma vez que seus efeitos adversos, sua ação simultânea com outras drogas, assim como suas possíveis adulterações e toxicidade podem geralmente ocorrer e afetar um grande número de pessoas (OLIVEIRA & ALMEIDA, 2016). Destaca-se então a importância de pesquisas e informações que assegurem a utilização de determinadas espécies vegetais e fitoterápicos de interesse clínico, pois mesmo possuindo baixa toxicidade, sua utilização imprópria associada a outros fatores de risco pode causar quadros graves que muitas vezes são subnotificados (ASSIS, 2015).

Plantas laticíferas são consideradas fonte potencial para produção de fármacos, tanto para uso popular, por meio de uso direto dos vegetais sem processamento industrial, tanto quanto para a alopatia e homeopatia (MONTEIRO, 2015). Neste contexto, insere-se as várias espécies de *Plumeria*, plantas produtoras de látex, conhecidas por suas propriedades medicinais especialmente relatadas por indígenas e tribais na Índia. Por décadas, essas populações dependeram unicamente de medicamentos brutos baseados em plantas para tratamento de inúmeras doenças (SHINE; PATIL; BAIRAGI, 2014). Na literatura, vários relatos demonstraram as propriedades farmacológicas como anti-inflamatória (GUPTA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2015), antinociceptiva (FERNANDES *et al.*, 2015), antibacteriana (BAGHEL *et al.*, 2010), antifúngica (FREITAS *et al.*, 2010), gastroprotetora (PINHEIRO, 2012), antidiarreica (SANTANA *et al.*, 2018), dentre outras de diferentes partes de plantas pertencentes ao gênero *Plumeria*.

No entanto, apesar desses relatos e das descrições de uso popular de plantas laticíferas no combate às mais variadas enfermidades, também existem registros na literatura sobre a efeitos adversos apresentados por elas. Essa toxicidade observada, pelo menos em parte, é ocasionada pela borracha presente no látex, entretanto, ensaios desenvolvidos têm esclarecido que efeitos tóxicos do látex podem facilmente ser eliminados a partir de seu fracionamento (AGUIAR, 2006; RAMOS *et al.*, 2006, BEZERRA, 2017).

Este trabalho abordou, o estudo dos aspectos toxicológicos do tratamento de camundongos com proteínas do látex de *Plumeria pudica*, planta laticífera, originária da Venezuela, encontrada na região Nordeste do Brasil e em abundância na cidade de Parnaíba no estado do Piauí. Um estudo inicial de caracterização bioquímica do seu látex foi realizado pelo laboratório de Microrganismos e Plantas da Universidade Federal do Piauí (BIOMIC), campus Ministro Reis Velloso. Uma fração proteica e solúvel em água obtida do látex de *P. pudica* (PLPp) demonstrou possuir propriedades farmacológicas como anti-inflamatória, antinociceptiva (FERANDES *et al.*, 2015), antidiarreica (SANTANA *et al.*, 2018). Nestes estudos, os autores demonstraram que tais propriedades farmacológicas são atingidas quando 40 mg/kg de PLPp são administrados por via intraperitoneal. Fato que estimulou conseqüentemente a investigação de suas potencialidades em novos modelos farmacológicos e a avaliação da toxicidade aguda e subcrônica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS LATICÍFERAS E O LÁTEX

Dentre a grande variedade de plantas que compõem o Reino Vegetal, mais de 35.000 espécies exsudam látex, que tem como origem de sua palavra o latim lac, lactis e que possui como significado “fluido”. Encontrando-se distribuídas em 40 famílias, o que corresponde aproximadamente a 10% de todas as angiospermas, compreendendo as plantas que pertencem ao grupo das monocotiledôneas e das dicotiledôneas (KONNO, 2011; RAMOS *et al.*, 2012; PEREIRA, 2014; VIANA, 2015).

Geralmente plantas laticíferas são mais frequentemente encontradas em climas tropicais, representando 12,2% das famílias e 14 % das espécies desse clima. Já no clima temperado representam apenas 4,9 % das famílias e 5,9 % das espécies (KONNO, 2011). Plantas consideradas comuns do nosso cotidiano são laticíferas, *Plumeria rubra* (jasmim), *Calotropis procera* (bombardeira), *Cryptostegia grandiflora* (bombom), *Euphorbia tirucalli* (aveloz) e *Achras sapota* (sapoti) são representantes desse grupo. Entre as famílias produtoras de látex destacam-se a Euphorbiaceae e Apocynaceae, embora existam outras famílias que produzem tais como: Papaveraceae, Moraceae, Convolvulaceae, Asteraceae, Araceae, Alliaceae e Musaceae (PINHEIRO, 2012).

A planta produtora de látex mais conhecida mundialmente é a *Hevea brasiliensis* (seringueira), espécie da região amazônica conhecida como “árvore da borracha”. A borracha, matéria-prima extraída da seringueira, e oriunda de seu fluido laticífero mudou o rumo da indústria no século XIX. A partir desta, foi gerado uma variedade de produtos industrializados, dentre os quais se destaca o pneu para automotivos e as luvas descartáveis utilizadas por profissionais da área de saúde. E justamente devido a sua importância comercial que esta planta e seu látex são os mais estudados entre os conhecidos (VIANA, 2015).

A produção do látex ocorre em espécies que não necessariamente apresentam uma relação evolutiva direta, sugerindo uma origem polifilética deste traço (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). Os vasos condutores de látex presentes em plantas, diferentemente dos ductos primários, xilema e floema, atuam de maneira secundária transportando produtos intrínsecos do metabolismo vegetal os quais participam principalmente da defesa da planta (PICKARD, 2008).

O látex é considerado uma secreção vegetal que se apresenta geralmente como um líquido de aspecto leitoso, e que dependendo da planta pode ter coloração

avermelhada, amarelada, escura, transparente e ser mais viscoso ou não. Diversas partes da planta podem conter este fluido, porém ele encontra-se de forma copiosa nos tecidos verdes como as folhas, os frutos e o caule (PICKARD, 2008; AGRAWAL & KONNO, 2009).

Várias hipóteses sobre a real função do látex para a planta são propostas, e entre estas podemos citar: excreção de resíduos do metabolismo, cobertura de tecido danificado e defesa da planta contra os ataques de predadores (KONNO, 2011). A mais aceita é a de que o látex serve prioritariamente para a defesa da planta contra herbívoros e patógenos, fato que é evidenciado, principalmente pela presença de proteínas relacionadas à defesa contra organismos (PINHEIRO, 2012).

Algumas espécies além de látex também exsudam resina. E o que diferencia o látex de gomas e resinas é o fato de que estas são secretadas em espaços intercelulares ou contidas em vasos mortos. O látex, por outro lado, encontra-se localizado dentro de um sistema de canais denominados laticíferos, que são células vivas detentoras da capacidade de regular a composição química do látex (PEREIRA, 2014).

Assim, considerando o aspecto anatômico dos laticíferos, dois tipos podem ser encontrados: os laticíferos articulados, os quais são formados por células sequenciais interconectadas por perfurações em suas paredes celulares e os laticíferos não articulado formado por uma única célula alongada que se desenvolve nos espaços intercelulares e eventualmente se ramificam nos tecidos das plantas de um modo similar às hifas de fungos. (AGRAWAL & KONNO, 2009). Apesar dessa classificação estrutural dos laticíferos, não existe uma relação com o grupo taxonômico; sendo assim, diferentes tipos de laticíferos podem ocorrer em diferentes espécies dentro de uma mesma família (CANAVEZE, 2012).

2.1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LÁTEX

A produção de látex pelos laticíferos é considerada bastante variável assim como suas características físicas e químicas. O látex representa o conteúdo citoplasmático dos laticíferos. O qual se apresenta como uma dispersão coloidal, na qual a borracha representa a fase dispersa constituída em média por 96% de hidrocarbonetos, 1% de proteína, 3% de lipídios e traços de magnésio, potássio e cobre. E a fase aquosa apresenta diferentes classes de compostos suspensos ou em solução, incluindo proteínas, carboidratos, bases nitrogenadas e restos celulares (MESQUITA; OLIVEIRA, 2010; VIANA, 2011).

Um dos principais componentes do látex é a borracha natural, composta principalmente de cis-1,4-poli-isopreno, muito importante para as plantas, devido às suas propriedades físicas como elasticidade, resiliência, resistência à abrasão e impacto, a eficiente dispersão de calor e maleabilidade em baixas temperaturas (AOKIA *et al.*, 2014).

Geralmente o látex apresenta coloração esbranquiçada, semelhante ao leite como acontece em *Hevea brasiliensis* e *Carica papaya*. Entretanto, algumas plantas apresentam um fluido transparente (*Nerium indicum*), ou de tom amarelo-alaranjado (*Chelidonium majus*), ou ainda apenas amarelo ou laranja (*Ficus septica* e *F. beguetensis*). Nos fluidos com coloração branca a borracha é a responsável pela cor e viscosidade apresentada. Porém a concentração deste componente varia entre diferentes espécies, podendo perfazer em alguns casos quase metade do látex fresco (KONNO, 2011; FERNANDES, 2014).

Vários dos compostos presentes no látex já foram estudados e analisados quanto suas características bioquímicas. E estas características estão geralmente relacionadas as atividades desempenhadas por este fluido na fisiologia da planta (KONNO, 2011; GU *et al.*, 2014).

Konno (2011) ao reunir informações obteve uma lista de compostos químicos e proteínas, como por exemplo quitinas e proteases cisteínicas, encontradas no látex de diversas plantas e que possuem participação comprovada na defesa contra insetos herbívoros. Relata-se ainda a presença de uma grande variedade de metabólitos secundários, dentre eles o isopreno um monômero constituinte da borracha, o poli-isopreno responsável pela viscosidade deste fluido, além da presença de outros terpenóides produzidos por algumas espécies. Cita-se ainda a presença cardenolídeos, compostos fenólicos e alcaloides, compostos comumente tóxicos para animais, fungos e bactérias e que exercem seu efeito por meio de diferentes mecanismos de ação.

O látex possui uma grande variedade de proteínas, sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas (MONTEIRO, 2015). O látex proveniente de vegetais é uma importante fonte de proteases e mais de 110 famílias de distintas plantas laticíferas se caracterizam por apresentar, pelo menos, uma enzima proteolítica em sua composição química (DOMSALLA & MELZIG, 2008; LUZ, 2012). Diferentes enzimas têm sido identificadas como sendo parte deste; dentre elas destaca-se a presença das proteases cisteínicas e serínicas (RAMOS *et al.*, 2010; RASMANN; JOHNSON; AGRAWAL, 2009; PATEL; SINGH; JAGANNADHAM, 2007; TOMAR;

KUMAR; JAGANNADHAM, 2008). As oxidases comumente encontradas em látex são peroxidases, polifenol oxidases e lipogenase (SETHI *et al.*, 2009, KONNO, 2011). Além disso, outras classes de enzimas como quitinases (RAMOS *et al.*, 2010; KITAJIMA *et al.*, 2010, KONNO, 2011); lipases (FIORILLO *et al.*, 2007), fosfatases (KONNO, 2011); lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (GIORDANI & LAFON, 1993), beta- 1,3- glucanases (CHEYE & CHEUNG, 1995), dentre outras são encontradas.

No látex de *H. brasiliensis*, *por exemplo*, vários destes compostos tem participação em processos fisiológicos da planta como na biossíntese da borracha, na coagulação do látex e no sistema de defesa (FERNANDES, 2014, MONTEIRO, 2015). Proteínas que contém atividade enzimática, em especial as proteases, são indispensáveis em alguns processos fisiológicos do vegetal, tais como no crescimento e desenvolvimento da plântula, na germinação, nos ritmos circadianos, senescência e morte celular programada. A maioria das proteases encontradas no látex pertence à classe das cisteíno ou às serino proteases, enquanto apenas uma foi relacionada como aspártico protease (DEVARAJ; GWODA; PRAKASH, 2008), porém nenhuma metaloprotease foi detectada (DOMSALLA & MELZIG, 2008). Estas enzimas são capazes de ativar receptores específicos de proteases agindo desta forma como relevantes agentes farmacológicos ou toxicológicos (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

Já as quitinases, são responsáveis pela catálise da hidrólise da ligação β -1,4 da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante do mundo. No látex geralmente realizam funções relacionadas a defesa contra fungos fitopatógenos e insetos herbívoros, uma vez que a quitina frequentemente constitui a parede celular destes micro-organismos e a membrana peritrófica de insetos (THIMOTEO, 2011; FERNANDES, 2014).

Essa diversidade molecular encontrada nos fluidos laticíferos sugere que este tecido especializado está relacionado aos aspectos defensivos da planta, demonstrados principalmente pela ocorrência de diferentes proteínas assinaladas como proteínas relacionadas a patogênese vegetal e substâncias causadoras de eventos toxicológicos ou até mesmo letais para mamíferos (MONTEIRO, 2015).

2.1.3 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO LÁTEX VEGETAL

Vários são os relatos sobre diferentes efeitos biológicos produzidos por plantas laticíferas. Provenientes de relatos de origem popular ou resultados de pesquisas científicas, tais fontes de informação demonstram que praticamente todas as partes da planta são capazes de causar a promoção de atividades importantes sobre sistemas animais ou microrganismos, desde folhas e raízes até o próprio látex. Mesmo que alguns resultados sejam atribuídos a compostos orgânicos do metabolismo secundário produzidos por estas plantas, até pouco tempo não havia descrições sobre as suas proteínas constituintes e em especial, as proteínas do látex (MARQUES, 2012; MONTEIRO, 2015).

Agra *et al.* (2007) relatam o uso do látex de diferentes espécies para tratamento das mais variadas enfermidades na medicina popular, citando como exemplo: *Plumeria rubra* (jasmin), *Castilla elástica* (árvore da borracha do Panamá), *Parthenium argentatum* (guayule), *Synadenium umbellatum* (cola nota), *Jatropha mollissima* (pinhão-bravo) e *Jatropha gossypifolia* (pinhão-roxo).

Pesquisas relacionadas a bioprospecção, caracterização e investigação de atividades biológicas de compostos presentes no látex de plantas tem estado presente na literatura científica, assim como investigações quanto a suas propriedades farmacológicas. Destacando-se a presença de atividades, como, antitumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010), anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2010), antiartríticas (SARATHA & SUBRAMANIAN, 2012), analgésica (FERNANDES *et al.*, 2015), antifúngica (FREITAS *et al.*, 2015), antidiarreica (SANTANA *et al.*, 2018),

Potenciais como anti-inflamatório e antinociceptivo de espécies laticíferas têm sido pesquisados (KUMAR *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2013). O extrato etanólico proveniente do látex de *Himatanthus drasticus*, *por exemplo*, apresentou ação antinociceptiva (COLARES *et al.*, 2008) e uma substância isolada a partir deste então demonstrou ter efeito anti-inflamatório. Em outro estudo realizado por Lucetti (2010) o látex de *Himatanthus drasticus* foi mais uma vez testado e sua atividade analgésica avaliada por meio do teste de formalina, obtendo-se como resultado a presença de atividade analgésica inibindo tanto a fase neurogênica como a inflamatória. Também foi demonstrado que o látex é capaz de inibir significativamente o edema da pata induzido por carragenina e dextrana, assim como a migração de neutrófilos para a cavidade

peritoneal induzida pela carragenina. O látex de *H. drasticus* apresentou ainda uma significativa inibição da mieloperoxidase (MPO) e uma diminuição do número de células que expressam atividade de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) na pata dos ratos submetidos ao edema induzido por carragenina.

O látex de *C. procera* outra espécie bastante estudada quanto a seu látex e seu potencial farmacológico, é conhecida na medicina popular por apresentar propriedades curativas contra dermatites causadas por fungos e bactérias (OLIVEIRA, 2009). Muitas propriedades farmacológicas já foram demonstradas experimentalmente. Tais como o efeito anti-inflamatório, que foi observado após a administração oral dos extratos aquoso e metanólico obtidos a partir do látex de *C. procera*. Ambos reduzindo significativamente o edema de pata induzido por carragenina e formalina. Adicionalmente foi demonstrada uma inibição do infiltrado celular e do edema subcutâneo induzido por carragenina sugerindo que o extrato desse látex exerça sua atividade anti-inflamatória principalmente ao inibir os mediadores químicos inflamatórios, histamina e bradicinina (ARYA; KUMAR, 2005). Outro estudo apontou que uma fração proteica do látex de *C. procera* produz uma redução do rolamento e da aderência de leucócitos na micromusculatura mesentérica. Efeito o qual é mediado por uma elevação sérica de óxido nítrico em um modelo de peritonite em ratos (RAMOS *et al.*, 2009).

A atividade nociceptiva de proteínas do látex tem sido apontada usando diferentes modelos experimentais com camundongos, por meio de testes como formalina, placa quente e contorções (SOARES *et al.*, 2005). A atividade citotóxica in vitro de proteínas laticíferas provenientes do látex de *C. procera* também foi avaliada. LP, por conseguinte, exibiu uma considerável citotoxicidade IC (50), com valores variando entre 0,42-1,36 $\mu\text{g/ml}$ em células da linhagem SF295 e MDA-MB-435, respectivamente. Adicionalmente quando células mononucleares saudáveis do sangue periférico foram expostas a LP (10 g/ml) por 72 horas, nenhum efeito notável em sua morfologia ou viabilidade foi observado (OLIVEIRA, 2007).

2.2 O GÊNERO *PLUMERIA* L. E A ESPÉCIE *Plumeria pudica* (JACQ., 1760)

Plumeria pudica é uma planta laticífera pertencente ao Gênero *Plumeria*, à família Apocynaceae e a subfamília Plumierioideae. Gênero que possui uma abrangência de 130 espécies, as quais se encontram amplamente distribuídas nas regiões tropicais do

mundo. Sua denominação é uma homenagem ao botânico Charles Plumier, pesquisador que o descreveu.

As *Plumerias* destacam-se principalmente pela presença de metabólitos especiais do tipo iridóides, mas também pela presença de substâncias das classes dos terpenos, alcaloides indólicos, ácidos fenólicos, flavonóides glicosilados, lignanas e cumarinas (CORNELLIUS, 2006; BROW, 2008; ARAUJO, 2009). Várias espécies deste gênero também são conhecidas por sua importância medicinal, muitas vezes relacionadas a seu látex que se apresenta frequentemente como enérgico e corrosivo (CHOUDHARY; KUMAR; SINGH, 2014).

No Brasil a família Apocynaceae está presente em diversos biomas, abrangendo cerca de 850 espécies e 90 gêneros, possuindo grande importância devido a diversos exemplares com potencial medicinal. Inúmeras espécies desta família são utilizadas na medicina moderna, destacando-se as pertencentes aos gêneros *Catharanthus*, *Aspidosperma*, *Macrosiphonia*, *Mandevilla*, *Rauwolfia*, *Himatanthus*, *Strophantus* e *Plumeria* (JUNIOR; GARCEZ; GARCER, 2013).

Plumerias são conhecidas como extraordinárias plantas ornamentais e muitas vezes sendo encontradas em cemitérios. Possuem como característica serem bem adaptadas as intempéries climáticas como calor, seca e até mesmo elevada pressão atmosférica. Devido à beleza de suas flores são facilmente encontradas como plantas ornamentais em praças e jardins de muitas regiões. Várias de suas espécies são usadas na Índia e Indonésia como plantas ornamentais, em virtude do aroma de suas flores. Enquanto no Havaí e Taiti, são utilizadas para a confecção de colares, simbolizando “boas-vindas” (NELSON, 2009; PINHEIRO, 2012).

A *P. pudica*, proveniente da América tropical pode ser encontrada desde o sul do México até o norte da América do Sul, e de forma copiosa na Índia. No Brasil é conhecida popularmente como Jasmim-do-caribe ou buquê-de-noiva, devido ao arranjo de suas flores. Na Venezuela outro país onde se encontra amplamente distribuída recebe diferentes denominações como papola branca, atapaima branca, tamaiba ou floripondio (SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014; SANTANA, 2016).

Considerada um arbusto ou uma pequena árvore que cresce entre 3 a 4 metros de altura. A *P. pudica* (Figura 1) possui casca na cor cinza suave, folhas simples, muitas vezes comparadas a forma de colher, com pecíolo curto, brilhantes e de coloração verde-escura. Uma particularidade dessa espécie é que costumam perder suas folhas, em períodos de estiagem prolongada ou durante invernos muito rigorosos. Na extremidade

dos ramos, suas flores brancas e centro amarelado com 4 ou 5 centímetros são sempre formadas em aglomerados. Ao contrário de outros jasmims, suas flores não têm perfume e são infundiformes medindo de 5 a 6 cm florescendo grande parte do ano, de abril a dezembro. Apresentam frutos cilíndricos com cerca de 10-15 cm de comprimento normalmente suportado em pares. Conta ainda com a presença de galhos grossos, moles e quebradiços, e que produzem látex branco em abundância (VIANNA, 2011; BROWN, 2013).

A *P. pudica* é normalmente indicada para arborização urbana, de praças, parques e áreas degradadas, pois apresenta facilidade de germinação e manutenção. Uma vez que podem crescer desde florestas a solo secos, preferindo alguns lugares, como encostas rochosas abertas e muitas vezes calcária (BROWN, 2013).



Figura 1. Planta *Plumeria pudica* e seu aspecto geral. A- Árvore B- Flor C- Folha

2.2.1 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO GÊNERO *Plumeria*

Além de ornamentais, as espécies de *Plumeria* apresentam uma ampla diversidade fitoquímica e sendo muitas vezes utilizadas com finalidades terapêuticas. Na Índia, são utilizadas para diversos fins como remédio para diarreia, coceira, tosse,

febre, sangramento e até mesmo tumores (DEVPRAKASH *et al.*, 2012). Na América do Sul, chá das folhas, da casca e da madeira são usados como anti-helmíntico e purgativo. Já a polpa do fruto, o látex e a casca do tronco servem na Ásia Oriental e em algumas regiões da América do Sul como abortivo, para dor de dente, doenças de pele e para tratamento da sífilis (CORNELIUS, 2006; GUPTA, 2006; NELSON, 2009).

Espécies de *Plumerias* como a *P. rubra*, *P. bicolor*, *P. lancifolia*, *P. acuminata*, *P. alba*, *P. acutifolia*, *P. obtusa* e *P. obtusifolia* foram pesquisadas quanto a seus aspectos fitoquímicos (CORNELIUS, 2006). E apresentaram como resultado associações destas espécies com atividades biológicas como o que ocorreu em *P. acuminata* para as ações anti-inflamatória (GUPTA *et al.*, 2006); antinociceptiva e antipirética (GUPTA; MAZUMDER; GOMATHI, 2007). Para *P. rubra* com as anti-inflamatória e antinociceptiva (DAS *et al.*, 2013) e *P. alba* para as atividades antibacteriana e antifúngica (RADHA; SRIRAM; NARAYANAN, 2008).

Outras atividades farmacológicas também foram apontadas para a espécie *Plumeria rubra* como atividade analgésica, antálgica e antibacteriana (KUIGOUA *et al.*, 2010). Freitas *et al.* (2010) demonstraram que proteínas isoladas do látex de *P. rubra* apresentam atividade antioxidante e proteolítica *in vitro*. Chanda *et al.* (2011) em estudo realizado, apontaram que proteases isoladas deste látex tem atividade anti-inflamatória e cicatrizante. Já Pinheiro (2012) e Alencar *et al.* (2015) mostraram um efeito protetor apresentado por uma fração isolada do látex de *P. rubra* em lesão gástrica induzida por etanol.

Fernandes *et al.* (2015) em um estudo pioneiro submeteu o látex proveniente da *P. pudica* a procedimentos de centrifugação e diálise obtendo uma fração rica em proteínas, a qual foi denominada de PLPp. Esta fração foi primeiramente investigada quanto a presença de proteínas frequentemente encontradas em fluidos laticíferos, na qual identificou-se o perfil proteico de PL por meio de eletroforese evidenciando a presença de proteínas com massa molecular aparente variando de 14,0 a 45,0kDa. Além disso foram detectadas por ensaios colorimétricos proteinases cisteínicas e serínicas, inibidores de metaloproteases e quitinas. Em seguida, a PLPp foi estudada quanto a presença de atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva utilizando diferente modelos animais experimentais. Neste estudo, os autores observaram que PLPp promoveu resultados como a inibição do edema de pata induzido por carragenina de modo dose dependente (melhor dose 40mg/kg) em um evento que foi acompanhado pela redução da atividade de mieloperoxidase no tecido inflamado. PLPp mostrou-se também capaz

de reduzir a inflamação induzida por diferentes mediadores químicos inflamatórios (histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas E_2). E por fim a fração estudada ainda inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e reduziu a lambadura de pata no modelo de formalina, mas apenas na primeira fase, a neurogênica. Contudo não conseguiu prolongar o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente.

Uma vez que a fração proteica do látex de *P. pudica* (PLPp) apresentou ação anti-inflamatória, esta foi investigada quanto a capacidade de inibir a diarreia inflamatória induzida pela administração de óleo de rícino por via oral em camundongos (SANTANA *et al.* 2018). Como resultado foi observado que o pré-tratamento dos animais com diferentes doses de PLPp promoveu a inibição da diarreia dos animais, sendo a dose de 40 mg/kg a que apresentou melhor capacidade de inibição (59,7%). A redução das fezes diarreicas foi acompanhada pela diminuição da severidade da diarreia avaliada pela consistência das fezes na região perianal dos animais, ao mesmo tempo foi capaz de reduzir o volume do conteúdo intestinal (40% de inibição) e da motilidade do transito gastrointestinal (32%). A ação antidiarreica de PLPp foi acompanhada pela redução da atividade de MDA e aumento nos níveis de GSH tecidual no intestino dos animais, demonstrando a presença de um efeito protetor do processo oxidativo. Neste estudo, a participação de proteínas na atividade investigada também foi confirmada uma vez que a ação antidiarreica de PLPp foi abolida quando esta era submetida a desnaturação térmica antes de ser administrada nos animais.

Estes resultados demonstram o potencial farmacológico de proteínas presentes no látex desta espécie, e estimulam a investigação para outras potencialidades para o material. Estudos preliminares vêm demonstrando a capacidade de PLPp em proteger animais das doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e Colite Ulcerativa) induzida por ácido acético (dados não publicados). Por isso, um importante passo a ser desenvolvido envolve a continua identificação das moléculas presentes no látex, bem como sua avaliação quanto aos efeitos toxicológicos da administração aguda e subcrônica de PLPp em animais.

2.3 PLANTAS MEDICINAIS E TOXICIDADE

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos substâncias que podem ser

utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos (WHO, 2002; 2013).

As plantas consideradas medicinais já beneficiaram, e continuam a beneficiar a humanidade. Estas não necessitaram de testes clínicos como o que ocorre normalmente com fármacos sintéticos, habilitando seu uso tradicional ao longo dos séculos. Porém, ainda hoje muitas são utilizadas para tratamento de diversas enfermidades, embora existam medicamentos sintéticos no mercado para o tratamento das doenças. No entanto, plantas medicinais são consumidas em todo o planeta, seja com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e tóxicas, difundidas por usuários ou comerciantes (FERREIRA & PINTO, 2010; SOUSA, 2014).

Toxicidade é a capacidade de uma determinada substância de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo. Esta propriedade é verificada por meio da avaliação toxicológica obtendo-se dados como dosagem, sinais e efeitos provocados que irão determinar o potencial de toxicidade. (LIMA, 2009; TURMINA, 2012).

O uso ao longo dos tempos de plantas medicinais mostrou que algumas podem apresentar substâncias consideravelmente perigosas (LUNGUINHO, 2012). Muitas destas contêm substâncias capazes de desempenhar uma ação tóxica sobre organismos vivos. Exemplo dessas substâncias são os alcalóides beladonados, alcalóides pirrolizidínicos, alcalóides cumarínicos, glicosídeos cianogênicos (HCN), glicosídeos cardiotoxicos, oxalato de cálcio, proteínas tóxicas (toxicoalbuminas), saponinas, resinas (alcoóis, ácidos e fenóis), dentre outros (SOUZA, 2011).

Essas diferentes substâncias seriam desenvolvidas com a função de proteger a espécie dos seus predadores. Por isso, muitas podem estar acumuladas e apresentarem uma elevada toxicidade como os glicosídeos cianogênicos presentes na mandioca-brava, e as proteínas tóxicas como a ricina contidas na mamona, alcaloides como a coniina presentes na cicuta e estricnina, na noz- vômica (MARANHÃO, 2010).

Alguns determinados efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas dignos de relevância e que merecem ser relatados são os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos, além da ação tóxica renal que pode ser ocasionada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, motivadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocuraminas. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como por exemplo o ácido

oxálico, nitrato e ácido erúcio também estão presentes em muitas plantas consideradas de consumo comercial (LUNGUINHO, 2012; SILVA, 2015).

O relato de efeitos colaterais ao se utilizar o látex de forma íntegra para o tratamento de doenças tem sido relacionado à presença do cis-1,4-poli-isopreno (borracha) ou a presença de proteínas remanescentes em produtos manufaturados de borracha, denominada proteínas alergênicas. Novas pesquisas têm sido feitas na tentativa de se eliminar a fração correspondente à borracha e os elementos de baixo peso molecular (FREITAS *et al.*, 2007; RABELO, 2014). Essa remoção do conteúdo referente a borracha, no entanto, é um processo considerado simples, no qual pós a coleta, processos de centrifugações e diálises aos quais o látex é submetido, já conseguem garantir a recuperação das proteínas laticíferas por exemplo, livres de borracha e de outros componentes do látex (ALENCAR *et al.*, 2006, BEZARRA, 2017).

Utilizando-se da visão científica, as pesquisas apontam que muitas plantas consideradas medicinais possuem substâncias agressivas e por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (SILVA *et al.*, 2015). Quando comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos podem parecer de pouca relevância, porém representa um sério problema de saúde pública (FERREIRA & PINTO, 2010; LUNGUINHO, 2012, MARTINS; GARLET, 2016).

Toda substância no geral é capaz de produzir efeitos tóxicos, e essa capacidade tóxica está relacionada a fatores como dose, tempo, modo e frequência de administração. A obtenção de dados toxicológicos em humanos é bastante limitada devido às questões éticas, morais e legais. Sendo assim, a maioria desses dados é conseguido por meio de testes pré-clínicos que utilizam animais de laboratório em condições normalmente padronizadas (MARANHÃO, 2010; RUPPENTHAL, 2013).

2.4 TOXICOLOGIA PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS

Os ensaios toxicológicos são realizados para determinar os níveis de exposição as substâncias que não ocasionem prejuízo ao ser humano. Para isso, a determinação desse nível deve ser feita analisando diversos níveis e parâmetros (MOURA *et al.*, 2012).

Pesquisas envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, geralmente fazem uso de parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliação dos possíveis sinais de toxicidade (MARIZ, 2007; LUNGUINHO, 2012;

XAVIER, 2015). Nesses estudos farmacológicos/ toxicológicos, após exposição às drogas, parâmetros quais estão relacionados a possíveis alterações na função hepática, como transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como ureia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como eritograma, leucograma e plaquetograma, são, portanto, analisados. Os exames anatomopatológicos (macro e microscópico) são considerados de extrema relevância, pois estes avaliam e analisam a estrutura e função, em nível celular. Sendo assim, a avaliação desses parâmetros são extremamente importantes na determinação de possíveis efeitos tóxicos de qualquer droga analisada (LUNGUINHO, 2012; LIMA, 2014; XAVIER, 2015).

Os animais têm sido empregados como modelos vivos para avaliação do risco toxicológico de diferentes substâncias e medicamentos. Porém apesar dos avanços no desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação toxicológica, os resultados com melhor desempenho em termos de preditibilidade de efeitos humanos são obtidos em modelos clássicos de experimentação animal. As espécies mais comumente utilizadas em investigações biomédicas são, portanto: os roedores (95%). Entre estes: ratos e camundongos (90%), hamsters (2%) e outros (3%) (MARIZ, 2007; TREVISAN, 2012).

O primeiro movimento social a respeito de uma nova visão sobre as pesquisas que utilizam e provocam dor em animais vertebrados foi denominado *Cruelty to Animals Act* e foi escrita em 1876 (FINN & STARK, 2015). Após essa manifestação, diversos autores asseguraram para o desenvolvimento de boas pesquisas deve-se respeitar o programa 3R's. Programa dessa forma nomeado devido às três palavras em inglês que regem o programa - *Reduction, Refine, Replace* – que em português significam - Reduzir, Refinar e Substituir. Programa o qual contém como principal objetivo reduzir o número de animais utilizados em pesquisas, além de buscar o aperfeiçoamento de técnicas as quais permitam diminuir o sofrimento dos animais e substituir animais por outras formas de vidas, como os estudos *in vitro* (CRUZ & ANGELIS, 2012; MOURA *et al.*, 2012).

No Brasil, o estudo pré-clínico de plantas medicinais está regulamentado pela RDC Nº 90 de 16 de março de 2004 a qual norteia alguns ensaios de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e de longa duração (trinta dias a um ano, a depender da frequência do produto) (BRASIL, 2004). Esses ensaios os quais possuem como objetivo a comprovação da eficácia e a toxicidade das plantas visando os seus benefícios para o

ser humano. Ao mesmo tempo em que permitem analisar o perfil de possíveis efeitos adversos relacionados às doses utilizadas e a um possível mecanismo de ação em inúmeras espécies de animais de experimentação (MARANHÃO, 2014).

Uma das formas de proceder à avaliação toxicológica é através da administração de quantidade do composto em estudo ou doses do extrato em animais podendo ser realizada a toxicidade aguda, subcrônica ou crônica (LIMA, 2009; TURMINA, 2012). A toxicidade aguda refere-se aos efeitos toxicológicos provenientes da administração da substância, em doses únicas ou múltiplas, em um período de 24 horas e seus efeitos em até 14 dias após a administração. Nesse tipo de estudo as informações conseguidas devem ser utilizadas para subsequentes pesquisas a respeito da toxicidade prolongada (MARIZ, 2007; MARANHÃO, 2010).

A toxicidade prolongada (toxicidade subcrônica com duração de 20 dias até 90 dias e crônica com duração de 6 meses a 1 ano) considera e caracteriza todos os efeitos causados por uma determinada substância quando administrada diariamente em animais de experimentação, em doses antecipadamente estabelecidas e por extensos períodos. Os parâmetros básicos a serem avaliados durante esse processo são as modificações observadas referentes à atividade motora e comportamental, a cor e textura dos pelos e na frequência cardiorrespiratória. Com a finalização do experimento os animais devem ser sacrificados para coleta de sangue (análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos) e remoção de órgãos para análises macro e microscópica (VILHENA, 2012; LIMA, 2014).

O conhecimento a respeito da toxicidade das plantas medicinais é de extrema importância para a condução do tratamento dos pacientes visando diminuir os riscos. Alguns episódios sobre os efeitos tóxicos que as plantas medicinais podem oferecer são conhecidos. Dentre eles pode-se citar o comprometimento do fígado e danos hepáticos agudos como hepatites causadas por plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos, principalmente envolvendo certas plantas como a cavalinha (*Teucrium chamaedrys L.*), confrei (*Symphytum officinale L.*), valeriana (*Valeriana officinalis L.*), escuteária chinesa (*Scutellaria ser baicalensis Georgi*), aloe vera (*Aloe barbadensis Mill.*). Existe ainda um relato de caso envolvendo um transplante hepático em uma mulher jovem americana a qual utilizava suplemento contendo kava-kava (*Piper methysticum G. Forst*). Nefropatias seguidos de rápida falência renal pela ingestão de plantas chinesas também tem sido relatada (BEZERRA, 2015).

Deste modo, os estudos da toxicidade de drogas candidatam a agentes farmacológicos principalmente àquelas provenientes de produtos naturais, torna-se de fundamental importância (LUNGUINHO, 2012). Nota-se que a avaliação de toxicidade, especialmente de medicamentos fitoterápicos, é um processo tido como muito significativo na promoção do uso racional de tais produtos. Entretanto, processo este, que deve ser planejado e desenvolvido de modo otimizado para que os melhores resultados possíveis sejam obtidos sem desperdício de recursos (MARIZ, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os aspectos toxicológicos do tratamento de camundongos com proteínas do látex da *Plumeria pudica* (PLPp) em modelo de toxicidade aguda e subcrônica.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obter uma fração proteica (PLPp) solúvel em água a partir do látex de *P. pudica*;
- ✓ Investigar a toxicidade aguda e subcrônica da administração de PLPp em camundongos Swiss;
- ✓ Determinar os efeitos da administração de PLPp no perfil hematológico de camundongos (contagem total e diferencial de leucócitos);
- ✓ Analisar os parâmetros bioquímicos (ALT, AST, creatinina, ureia) do fluido sanguíneo dos camundongos tratados com PLPp;
- ✓ Verificar possíveis alterações histológicas em órgãos vitais (fígado, baço e rim) dos camundongos tratados com PLPp;
- ✓ Avaliar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo glutationa (GSH) e malondialdeído (MDA) em órgãos vitais (fígado e rins) dos camundongos tratados com PLPp;
- ✓ Medir a atividade de mieloperoxidase (MPO) em órgãos vitais (fígado, baço e rins) dos camundongos tratados com PLPp;
- ✓ Determinar a DL50 da fração PLPp quando administrada por via intraperitoneal;
- ✓ Identificar proteínas em PLPp por espectrometria de massa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

4.1.1 Coleta e processamento do látex

A espécie foi identificada e sua exsicata depositada no Herbário Delta do Parnaíba da Universidade Federal do Piauí sob o número de depósito 2432. As coletas foram realizadas na cidade de Parnaíba-PI. A estratégia de coleta para obtenção do látex de *Plumeria pudica* ocorreu de acordo com metodologia utilizada por Fernandes *et al.* (2015) e descrita detalhadamente a seguir: O látex foi coletado após quebra do ápice caulinar da planta em tubos de plástico do tipo “falcon” sobre um volume de água destilada para finalizar uma razão de 1:1 (v:v). As amostras foram centrifugadas a 25 °C durante 10 minutos e 5.000 x g. O sobrenadante foi submetido à diálise contra água destilada durante 48 horas a 8 °C utilizando membranas com capacidade de retenção de moléculas acima de 8 kDa. Em seguida o material foi novamente centrifugado utilizando as mesmas condições descritas acima e o sobrenadante, rico em proteínas foi liofilizado e denominado PLPp (proteínas do látex de *Plumeria pudica*). Este material então foi utilizado em todos os ensaios previstos e descritos a seguir.

4.2 ESTUDO DO PERFIL TOXICOLÓGICO

4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas (n=30) (*Mus musculus*, variedade Swiss) provenientes do Biotério da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas contendo seis animais, em ambiente climatizando (24±1°C), obedecendo ao ciclo de claro/escuro (12h/12h) e recebendo ração e água *ad libitum*.

Os protocolos experimentais utilizados ocorreram de acordo com as normas internacionais e com os padrões éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (UFPI) aprovado com parecer (037/15).

Todos os procedimentos e cuidados foram conduzidos de acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4.2.2 Avaliação da toxicidade aguda

Os ensaios de toxicidade aguda basearam-se nas orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento

Econômico (OECD), de acordo com o guia para testes de produtos químicos. Foram realizadas exposições agudas em camundongos, por via intraperitoneal, seguindo o protocolo 423 da OECD, com modificações. Os camundongos (n=12) foram divididos em dois grupos. O grupo experimental recebeu 40 mg/kg da fração proteica solubilizada em solução salina por via intraperitoneal durante dez dias consecutivos. Enquanto o grupo controle recebeu 500 µl apenas de solução salina a 0,9%. O período total de observação após administração da dose foi de dez dias.

4.2.3 Avaliação da toxicidade subcrônica

Os ensaios de toxicidade basearam-se nas orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), de acordo com o guia para testes de produtos químicos. Foram realizadas exposições subcrônicas em camundongos, por via intraperitoneal, seguindo o protocolo 407 da OECD com modificações. Os camundongos (n=12) foram divididos em dois grupos. O grupo experimental recebeu doses únicas e diárias de 40 mg/kg da fração proteica solubilizada em água destilada por via intraperitoneal durante vinte dias consecutivos. Enquanto o grupo controle recebeu apenas 500 µl de solução salina a 0,9%. O período total de observação foi de vinte dias. A toxicidade subcrônica foi analisada pelos mesmos parâmetros empregados na avaliação da toxicidade aguda, sem alteração na metodologia.

4.2.4 Avaliação ponderal

Os animais foram pesados em balança semi-analítica antes da administração da fração PLPp em dias alternados durante os 10 dias e 20 dias de tratamento com a fração PLPp. De posse dos dados, foi calculado o peso médio dos animais.

4.2.5 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

Para a execução destes exames, ao final do tratamento com PLPp, os camundongos foram anestesiados com uma associação de Ketamina (60 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal e procedida a coleta de sangue por meio de punção cardíaca, no 11º e 21º dia para os animais submetidos a toxicidade aguda e subcrônica, respectivamente. O sangue coletado foi então transferido para tubos a vácuo, descartáveis, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). E as amostras

foram consecutivamente homogeneizadas por inversão, identificadas e armazenadas a 4°C até o processamento.

Os parâmetros hematológicos dos animais como a contagem global de leucócitos, foi realizada em câmara de Newbauer. Extensões sanguíneas coradas com Hematoxilina-eosina foram confeccionadas para a contagem diferencial de leucócitos para posterior leitura em microscópio de óptico conforme metodologia proposta por Coura *et al.*, 2012.

4.2.6 Exames bioquímicos séricos

As amostras obtidas por punção cardíaca foram centrifugadas por cinco minutos a 3.000 rpm para obtenção do soro. As amostras de soro foram separadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml e armazenadas a -20°C até o momento de realização das provas bioquímicas: mensuração da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além dos valores de ureia e creatinina. As dosagens foram realizadas empregando-se reagentes comerciais padronizados (Labtest®) e lidas posteriormente em um espectrofotômetro UV-Visível utilizando-se o modo fotométrico.

4.2.7 Avaliação da massa dos órgãos

Após certificação da anestesia, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e em seguida uma laparotomia foi realizada de modo a expor as cavidades para obtenção de fígado, baço e rins dos animais tratados com PLPp ou salina 0,9 %. Estes tiveram suas massas absolutas aferidas em uma balança analítica e as suas respectivas massas relativas calculadas.

4.2.8 Avaliação histopatológica

Após a eutanásia fígado, baço e rins retirados dos animais foram fixadas em formalina tamponada 10%. As amostras foram processadas em diferentes etapas dentre elas a desidratação em séries crescentes de etanol (70-100%) (Dinâmica®), diafanização em xilol (Cromoline®), seguido de inclusão em parafina histológica (Dinâmica®). Os blocos de inclusão foram seccionados, em micrótomo convencional, em uma espessura de 5,0 µm. As lâminas foram preparadas com os cortes obtidos, os quais foram submetidos ao processo de coloração tradicional pela técnica da hematoxilina e eosina (Dinâmica®) para posterior examinação em microscópio óptico.

Na avaliação das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o fígado: bom estado de conservação, homogeneidade de aspecto, identificação de lóbulos hepáticos íntegros, espaçoporta íntegro e veias hepáticas bem definidas; cordões de sinusóides presentes, íntegros, confluindo para veia centro-lobular. Nos capilares sinusóides entendeu-se como normal a presença de algumas hemácias. Nas células hepáticas, consideraram-se normais aquelas com um ou mais núcleos íntegros, em geral centralizados, e nucléolos bem evidentes. No citoplasma, foi considerado padrão de normalidade encontrar áreas basófilas e eosinófilas. Nos rins, a normalidade obedeceu aos quesitos: bem conservados, apresentando corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros; os glomérulos formados por capilares, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas. Outros itens avaliados: cápsula de Bowman íntegra, presença de células cúbicas ou poliédricas, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleo arredondado. Na região medular, analisaram-se as alças de Henle junto aos capilares e túbulos coletores, estes com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico, quando dentro da normalidade. Para o baço foi considerado para avaliação de normalidade a integridade do tecido, polpas evidentes e organizadas, núcleos e citoplasma íntegros, ausência de necrose.

Para avaliar as alterações dos respectivos órgãos foram considerados: coloração padrão já bem estabelecida para as estruturas, alteração na morfologia de núcleos, rompimento de limites de alguma organela citoplasmática, presença de congestão vascular, áreas com infiltrado inflamatório, congestão de vasos e capilares, núcleos com cromatina extremamente condensada, edema, esteatose e áreas de degenerações reversíveis (hidrópica e gordurosa) e irreversíveis (necrose e apoptose).

4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE CELULAR E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES

4.3.1 Determinação dos níveis de glutathiona (GSH)

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada de acordo com o método proposto por Sedlak & Lindsay (1968). Amostras de tecido de fígado e rins correspondentes aos animais tratados com a fração PLPp ou salina 0,9% durante 10 dias e 20 dias respectivamente, foram homogeneizadas em EDTA 0,02M para consequente preparação de um homogenato a 10%. A seguir, alíquotas de 400µl do homogenato foram adicionadas a 320µl de água destilada e a 80µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material passou por centrifugação a 3000rpm por 15 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, 400µl do sobrenadante foi retirado e misturado a 800µl de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 20µl de DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura por fim agitada durante 3 minutos e sua absorvância mensurada a 412nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

4.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

A dosagem dos níveis de malondialdeído em fígado, baço e rins dos animais tratados com a fração PLPp, foram determinados pelo método de Mihara & Uchiyama (1978). Amostras de tecido foram homogeneizadas em KCl gelado 1,15% para preparação de um homogenato a 10%. Em sequência, alíquotas de 250µl do homogenato foram adicionadas em tubos contendo 1,5ml de H₃PO₄ a 1% e 500µl de uma solução de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos passaram por aquecimento, por um período de 45 minutos, em um banho de água a 100°C, a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, com a seguida da adição de 4ml de n-butanol. N-butanol foi acrescentado, as amostras que seguiram para agitação em um misturador “vortex” por um minuto, e posteriormente centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a uma absorvância de 520 e 535nm, e o resultado foi obtido pela diferença da absorvância nas duas leituras. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido.

4.3.3 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO no fígado, baço e rins, dos animais tratados com a fração PLPp, foram dosados através de técnica descrita por Bradley *et al.*, (1982). Fragmentos de tecido foram macerados em 1mL de tampão fosfato de potássio com 0,5% de hexadecil-trimetil-amônio brometo, na proporção de 1mL de tampão para 50mg de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 40.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Ao término desse processo, houve a pipetagem do material em duplicata, 10µL do sobrenadante e 200µL de uma solução de o-dianisidina (5mg/3mL tampão fosfato) contendo 15µL de H₂O₂ 1%, nos poços de uma placa de emsento de 96 poços. Foi avaliada a mudança na absorvância, a 450nm, entre os tempos 0 e 1 minuto e os resultados foram expressos como Unidades de MPO/mg de tecido.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De todos os experimentos foram calculadas as médias \pm EPM de certo número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ou teste de Tukey. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

4.5 DL 50 MEDIANA

A DL50 Mediana foi avaliada de acordo com o protocolo experimental Guideline 423 da OECD (OECD, 2001), o qual determina o valor da dose letal conforme a dose empregada do provável agente tóxico e o número de animais mortos. Os ensaios foram iniciados com a dose de 300 mg/kg conforme apresentado na Figura 2 e seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os experimentos foram conduzidos posteriormente com a dose limite de 2000 mg/kg. Os animais (n=6) receberam via intraperitoneal 1mL de PLPp em dose única. Os camundongos foram privados da alimentação por duas horas antes do início do experimento e por mais duas horas após a administração de PLPp. A água foi oferecida ad libitum até termino dos experimentos. E o período total de observação após administração da dose única foi de 14 dias.

Observações comportamentais sistemáticas foram realizadas avaliando o screening hipocrático, sendo os seguintes parâmetros avaliados: atividade geral (frequências de locomoção e levantar dos animais), frêmito vocal, irritabilidade, reflexo das córneas, reflexo auricular, resposta ao aperto de cauda, resposta ao toque, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força para agarrar, ataxia, tremores, convulsões, enrijecimento da cauda ou cauda ereta (straub tail), hipnose, anestesia, ptose, lacrimação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose que englobam características relacionadas ao sistema nervoso central e autônomo, ao sistema psicomotor e ao sistema sensorial. Estas observações foram mensuradas em escores (0-4), segundo Brito (1994) (anexo II). Os animais foram avaliados aos 30 minutos, 1 h, 1h 30, 2h, 2h 30, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h e 24h e a partir de então diariamente, até o 14º dia após o tratamento (Anexo 3).

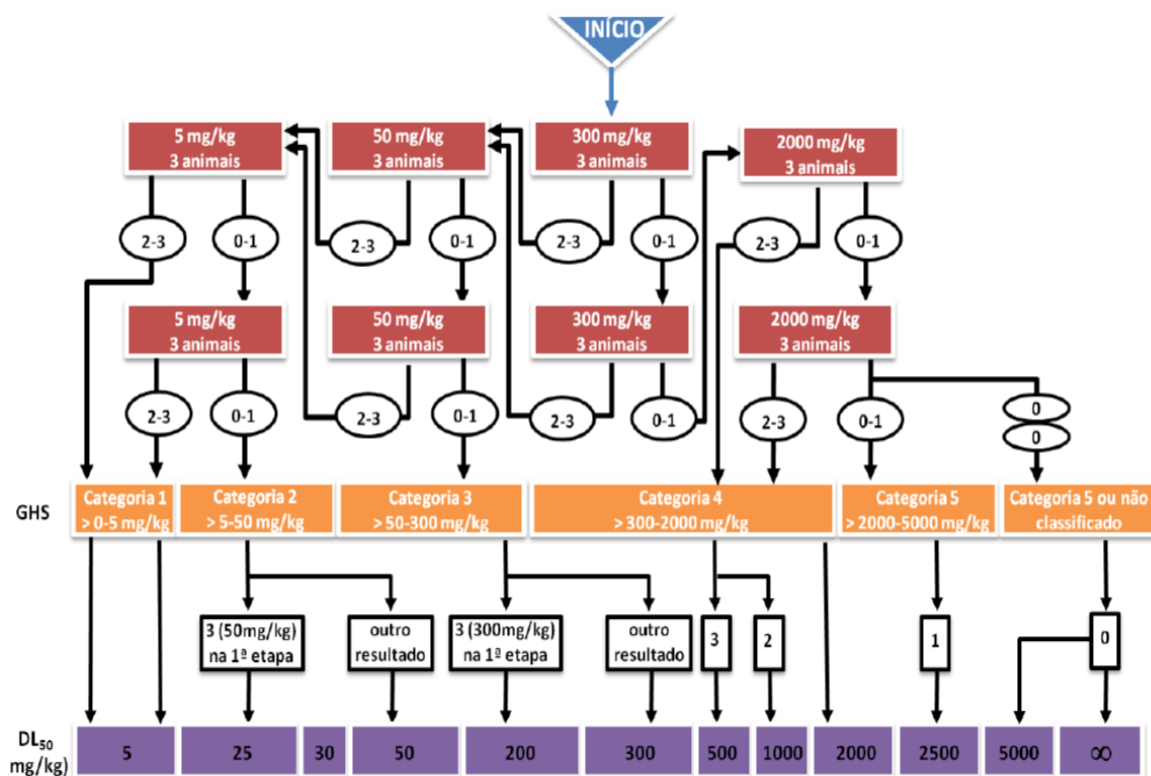


Figura 2. Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de dose letal a partir da dose de 300 mg/kg, empregando-se três animais de um único sexo por etapa. Fonte: OECD (2001).

4.6 ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÁTEX DE *Plumeria pudica*

A análise proteômica da fração PLPp foi realizada de acordo com metodologia utilizada por Sousa-Filho (2016). A fração PLPp foi digerida com tripsina e os resultado da digestão foi submetido à identificação de proteínas a partir do espectro de massas adquiridos em um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema 2D NanoUPLC-ESI. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte NanoLockSpray. As massas obtidas foram utilizadas para correlação com PMF através do “*Mascot search engine*” (Matrix Science, London-UK) e o *NCBI Data Bank* como banco de dados.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO PONDERAL

Os camundongos foram acompanhados quanto a sua massa corporal durante todo o tratamento nos ensaios de toxicidade. O peso dos animais foi devidamente registrado antes da administração de PLPp, e durante o tratamento. Assim, os resultados referentes ao peso dos camundongos tratados com PLPp na dose de 40 mg/kg para a avaliação da toxicidade aguda e subcrônica estão apresentados na Figura 3.

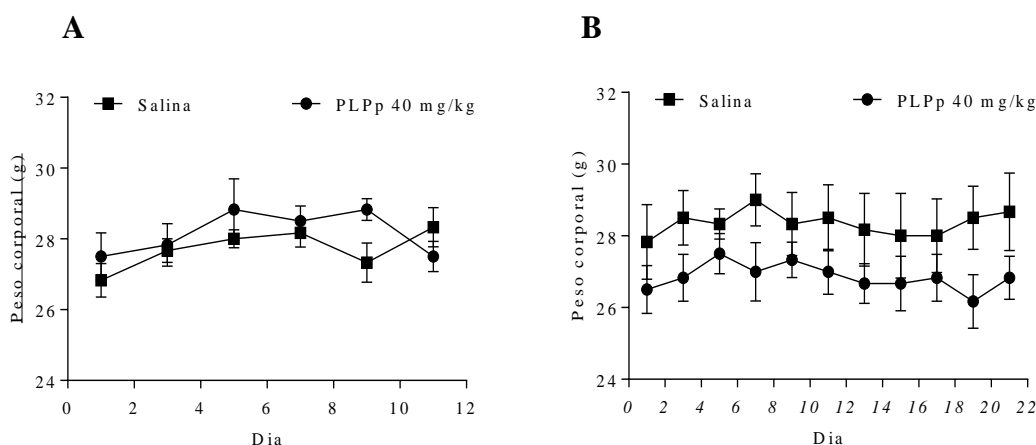


Figura 3: Evolução ponderal dos camundongos tratados com Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (PLPp) na toxicidade aguda (A) e subcrônica (B). Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com PLPp (40mg/kg) ou salina 0,9% durante 10 dias e 20 dias referentes a avaliação da toxicidade aguda e subcrônica respectivamente. Os resultados são expressos como média \pm EPM de seis animais por grupo. PLPp vs. grupo salina ($P < 0,05$); ANOVA seguido de teste *Student-Newman-Keuls*.

Considerando-se a diferença entre o peso inicial e o peso final dos animais de cada grupo, os resultados obtidos com a dose de 40 mg/kg demonstraram que a fração PLPp não interferiu no desenvolvimento ponderal dos animais. Não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com PLPp 40 mg/kg e os grupos controles (salina) tanto para a toxicidade aguda quanto para a toxicidade subcrônica.

5.2 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

No tocante a avaliação de parâmetros hematológicos, os resultados da contagem total e diferencial de leucócitos estão apresentados na Tabela 1. Os animais testados para o grupo de toxicidade aguda na dose 40 mg/kg com PLPp, por via intraperitoneal, tiveram seus resultados comparados com os animais controle (salina), não sendo constatada diferença significativa para os resultados do leucograma. Para os camundongos pertencentes ao grupo de toxicidade subcrônica também não foi

observada uma diferença significativa no valor do leucograma dos animais que receberam PLPp em relação ao grupo controle (salina).

5.3 EXAMES BIOQUÍMICOS SÉRICOS

Para o estudo analítico da toxicidade de PLPp, os parâmetros bioquímicos foram avaliados (Tabela 2). Em relação aos marcadores de hepatotoxicidade, os resultados revelaram aumento significativo de AST no grupo tratado com PLPp 40 mg/kg durante 10 dias (toxicidade aguda) em comparação com o controle salina. No entanto, não houve diferença significativa para o nível de AST entre o grupo PLPp 40 mg/kg tratado durante 20 dias (toxicidade subcrônica) em comparação com seu controle salina. Para avaliação de ALT, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo PLPp 40 mg/kg tanto para a toxicidade aguda quanto para toxicidade subcrônica. Além disso, os valores encontrados para ALT estão dentro dos limites considerados normais, enquanto nota-se que para AST o grupo experimental PLPp pertencente a toxicidade aguda encontra-se acima do valor considerado de referência.

Quanto aos marcadores da função renal, ureia e creatinina não houve diferenças significativas entre os grupos PLPp 40 mg/kg referentes a toxicidade aguda e subcrônica em relação aos seus respectivos controles (salina). Para ureia e creatinina nota-se que os valores encontrados estão dentro dos limites considerados normais para a espécie utilizada para a avaliação

Tabela 1. Contagem total e diferencial de leucócitos a partir do sangue periférico de camundongos tratados com Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) na toxicidade aguda e subcrônica.

	Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Total leucócitos (10^3 células/ μ l)	Contagem diferencial de leucócitos (10^3 células/ μ l)				
				Basófilos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos
Toxicidade Aguda	Salina	-	5,680 \pm 0,482	0,009 \pm 0,009	0,125 \pm 0,053	0,752 \pm 0,122	4,601 \pm 0,525	0,192 \pm 0,058
	PLPp	40	5,233 \pm 0,435	0,044 \pm 0,016	0,098 \pm 0,043	0,779 \pm 0,172	4,169 \pm 0,530	0,143 \pm 0,032
Toxicidade Subcrônica	Salina	-	5,947 \pm 0,398	0,030 \pm 0,020	0,019 \pm 0,013	1,217 \pm 0,116	4,367 \pm 0,393	0,156 \pm 0,036
	PLPp	40	5,467 \pm 0,391	0,000 \pm 0,000	0,019 \pm 0,012	0,836 \pm 0,075	4,400 \pm 0,339	0,211 \pm 0,043

Os dados são apresentados com média \pm E.P.M. de seis animais. Nenhuma significância estatística foi observada entre os grupos. ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls, ($p < 0.05$).

Tabela 2. Parâmetros Bioquímicos dos camundongos tratados com Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) na toxicidade aguda e subcrônica.

Parâmetros	Toxicidade Aguda			Toxicidade Subcrônica			Valor de Referência
	Salina	PLPp	P	Salina	PLPp	P	
AST(IU/L)	111,90 \pm 4,92	245,10 \pm 25,88	0,0047*	166,10 \pm 30,51	125,30 \pm 27,07	0,6181	128 \pm 60,6 ^a
ALT(IU/L)	64,31 \pm 2,95	49,76 \pm 5,23	0,4594	57,40 \pm 5,96	45,61 \pm 8,78	0,5648	49 \pm 22,6 ^a
Ureia(mEg/L)	56,62 \pm 3,34	54,09 \pm 1,14	0,9926	72,77 \pm 6,11	52,14 \pm 8,67	0,0967	37 \pm 16 ^a
Creatinina(mEg/L)	0,28 \pm 0,01	0,024 \pm 0,17	0,9976	0,22 \pm 0,13	0,38 \pm 0,15	0,8663	0,3 \pm 1,00 ^b

Os dados são apresentados com média \pm E.P.M. de seis animais. * vs grupo salina toxicidade aguda. ANOVA seguido por teste de Tukey, ($p < 0.05$). Fonte: ^a Loeb & Quimby, 1999. ^b Harkness & Wagner, 1993.

5.4 AVALIAÇÃO DAS MASSAS DOS ÓRGÃOS

Os pesos médios dos órgãos (fígado, baço e rins) dos camundongos fêmeas dos grupos tratados com a fração PLPp 40 mg/kg ou salina 0,9%, mensurados durante a coleta do material para análise histopatológica estão apresentados na Tabela 3. Os resultados obtidos a partir do peso dos órgãos de grupos experimentais tratados com PLPp, tanto para a avaliação da toxicidade aguda quanto para a avaliação da toxicidade subcrônica, não demonstraram valores significativamente diferentes daqueles apresentados pelos grupos controles que receberam apenas o veículo salina durante estes mesmos dias.

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos (fígado, baço e rins) dos camundongos tratados com Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (PLPp) e avaliados para toxicidade aguda e subcrônica.

	Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Fígado (g/100g peso corporal)	Baço (g/100g peso corporal)	Rim (g/100g peso corporal)
Toxicidade Aguda	Salina	-	4.18 ± 0.10	0.91 ± 0.08	0.55 ± 0.049
	PLPp	40	4.28 ± 0.11	0.99 ± 0.03	0.54 ± 0.11
Toxicidade Subcrônica	Salina	-	4.15 ± 0.11	0.95 ± 0.02	0.52 ± 0.047
	PLPp	40	4.16 ± 0.09	0.99 ± 0.02	0.61 ± 0.06

Os dados são apresentados com média ± E.P.M. de seis animais. Nenhuma significância estatística foi observada entre os grupos. (ANOVA) seguido de Student-Newman-Keuls, ($p < 0.05$).

5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica do fígado e baço de animais tratados (i.p) com 40 mg/kg de PLPp durante os 10 dias de avaliação aguda não indicaram sinais de toxicidade ou lesões teciduais para fígado e baço analisados (Figura 4). Ambos revelaram integridade tecidual se apresentando morfologicamente normais e semelhantes ao grupo controle. No entanto, observou-se a presença de uma leve congestão dos capilares glomerulares no rim do grupo experimental (Figura 4d). Essa alteração histológica foi de intensidade leve, ou seja, representa menos de 25% do campo analisado, e por isso não foi considerada relevante.

Em relação aos grupos tratados com PLPp 40 mg/kg durante 20 dias para avaliação subcrônica não se observou sinais de toxicidade ou lesões teciduais para fígado e rim (Figura 5). Ambos revelaram integridade tecidual se apresentando morfolologicamente normais e semelhantes ao grupo controle. No entanto, uma leve congestão no baço do grupo experimental (Figura 5f) foi observada. Essa alteração histológica foi de intensidade leve, ou seja, representa menos de 25% do campo analisado, e por isso não foi considerada relevante.

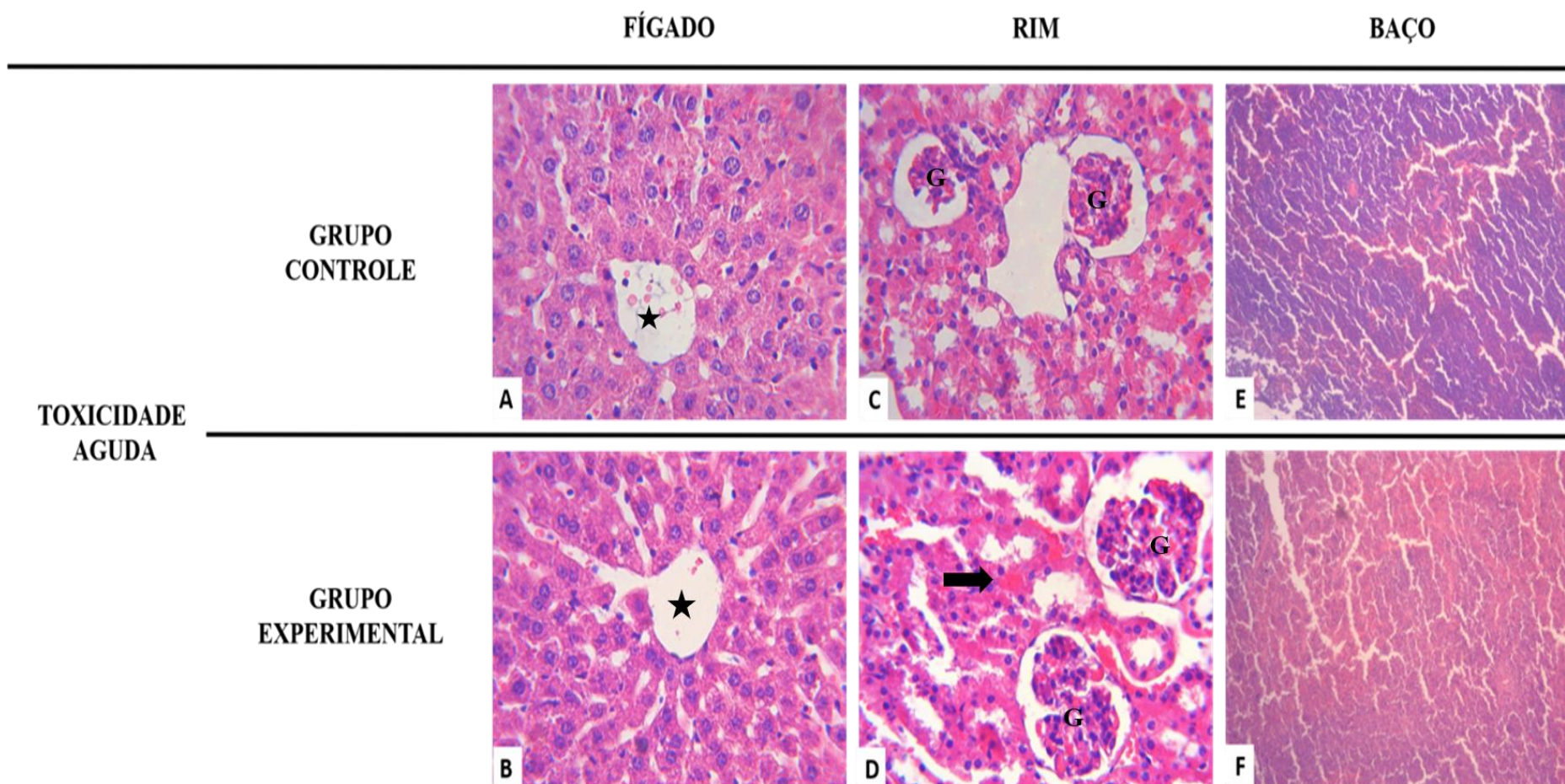


Figura 4. Análise Histopatológica de órgãos vitais: (A/ B) fígado, rim (C/D) e baço (E/F) dos camundongos tratados com solução salina (grupo controle) e 40 mg/kg de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp), durante 10 dias referentes ao ensaio de toxicidade aguda. Veia Central (estrela). Glomérulo (G). Congestão capilar (seta).

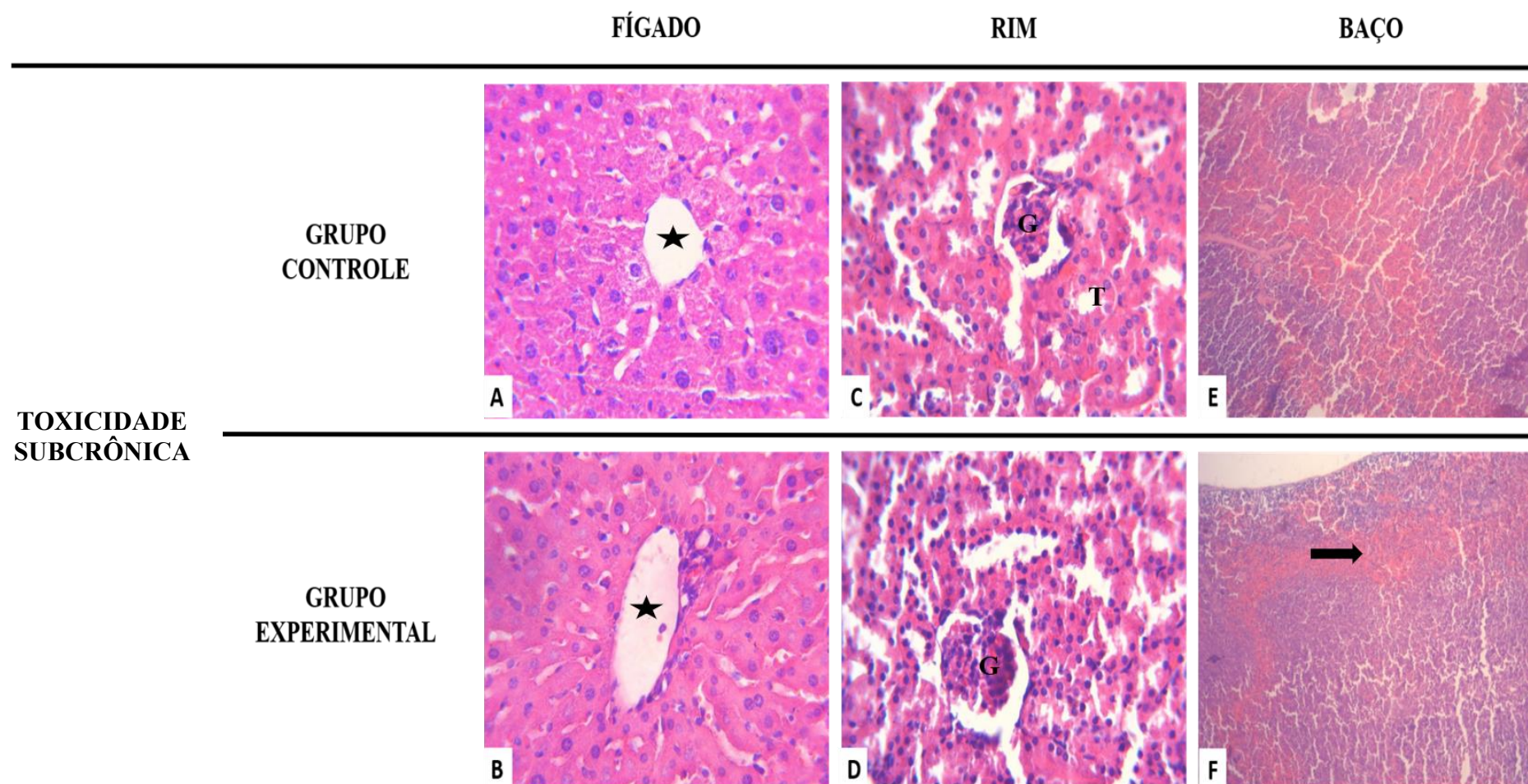


Figura 5. Análise Histopatológica de órgãos vitais: (A/B) fígado, rim (C/D) e baço (E/F) dos camundongos tratados com solução salina (grupo controle) e 40 mg/kg de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp), durante 20 dias referentes ao ensaio de toxicidade subcrônica. Veia Central (estrela). Glomérulo (G). Túbulo Renal (T). Congestão esplênica (seta).

5.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH)

Os ensaios de toxicidade aguda e subcrônica foram acompanhados quanto as defesas antioxidantes, que constituem sistemas bioquímicos que tendem a proteger as células contra os efeitos deletérios das espécies reativas do oxigênio (EROs). Para isso, fígado e rins dos animais pertencentes ao grupo salina 0,9 % e o grupo PLPp 40 mg/kg os quais passaram pelo período de avaliação aguda e subcrônica, foram coletados para dosagens dos níveis Glutationa (GSH) (Figura 6).

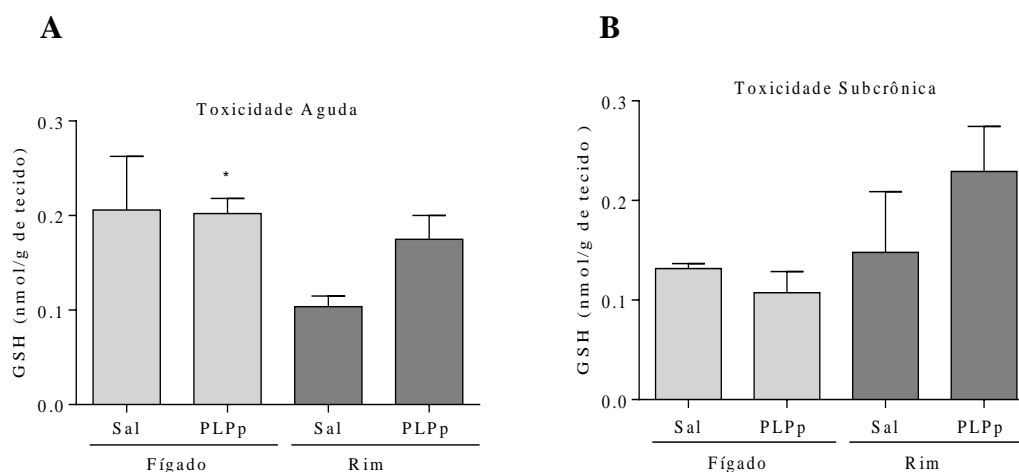


Figura 6. Efeitos de PLPp sobre o índice antioxidante glutaciona reduzida (GSH) em fígado e rim de animais submetidos a testes de toxicidade aguda (A) e subcrônica (B) utilizando proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp). Os animais foram tratados via intraperitoneal com PLPp 40 mg/kg ou salina 0,9 % durante 10 dias e 20 dias referentes aos ensaios de toxicidade aguda e subcrônica. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. * vs grupo salina toxicidade aguda. ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

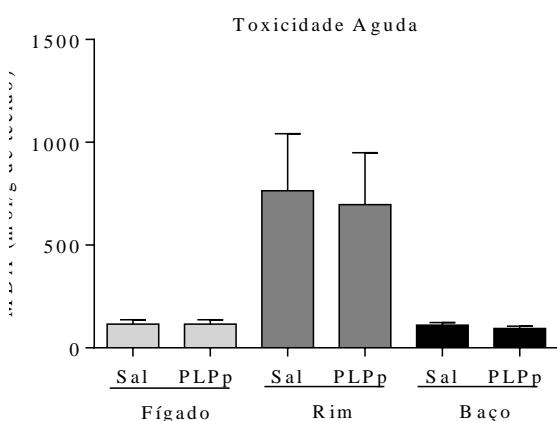
O tratamento com a fração PLPp 40 mg/kg durante os 10 dias referentes a avaliação aguda, foi capaz de manter os níveis de GSH no fígado sem diferença significativa ao apresentado pelo grupo controle salina 0,9 %. Quanto aos valores apresentados pelos rins dos animais, foi demonstrado que o nível de GSH foi significativamente maior nos grupos tratados com PLPp 40 mg/kg.

Em relação a avaliação da toxicidade subcrônica os dados evidenciam um maior nível de GSH no fígado dos animais que receberam a dose de 40 mg/ kg durante os 20 dias de tratamento, porém esse aumento não foi considerado significativo. Em relação ao rim observou-se que não houve diferença significativa entre o grupo PLPp e o grupo controle.

5.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

Para a avaliação de marcadores bioquímicos envolvidos com o processo oxidativo nos ensaios de toxicidade aguda e subcrônica, foi realizada a dosagem níveis de malondialdeído (MDA) no fígado, baço e rins dos animais tratados com PLPp 40 mg/kg e salina 0,9 % para avaliação aguda e subcrônica respectivamente (Figura 5).

A



B

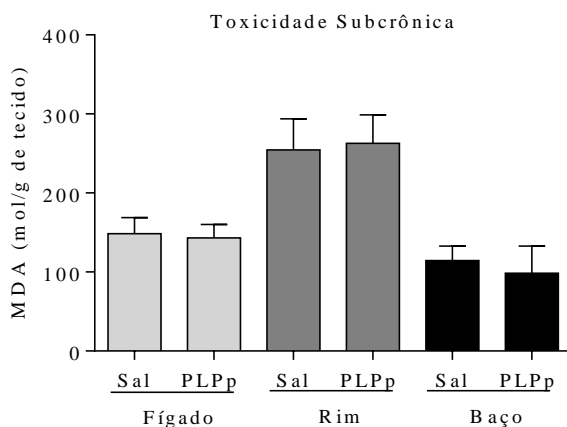


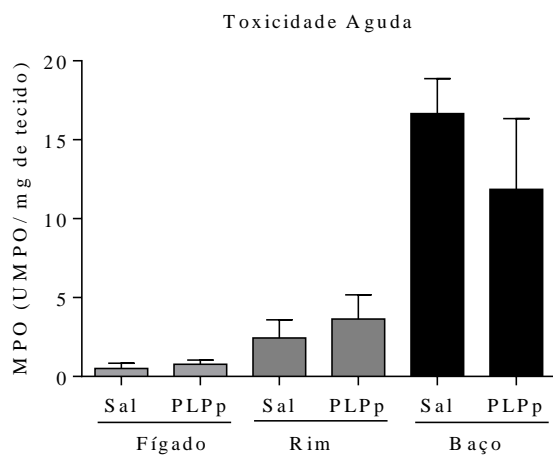
Figura 7. Efeitos de PLPp sobre o marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) em fígado, baço e rim de animais submetidos a testes de toxicidade aguda (A) e subcrônica (B) utilizando proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp). Os animais foram tratados via intraperitoneal com PLPp 40 mg/kg. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. ANOVA seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

Os níveis de MDA no fígado, baço e rins não apresentaram diferença significativa tanto para os grupos tratados com PLPp 40 mg/kg durante os 10 dias referente a toxicidade aguda quanto para o grupo tratado durante 20 dias relacionado a toxicidade subcrônica, em relação aos seus respectivos grupos controle salina.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase nos órgãos (fígado, baço e rins) não foi observado diferença significativa dos grupos tratados com PLPp 40 mg/ kg durante os 10 dias de avaliação aguda e os 20 dias de avaliação subcrônica quando comparados aos seus respectivos grupos salina.

A



B

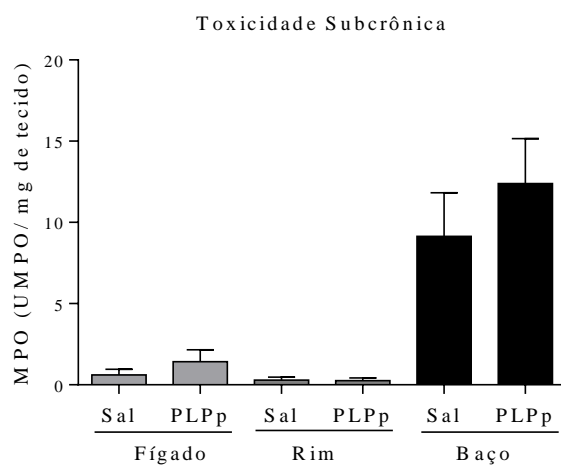


Figura 8. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) em fígado, baço e rim de animais submetidos a testes de toxicidade aguda (A) e subcrônica (B) utilizando proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp). Os animais foram tratados via intraperitoneal com PLPp 40 mg/kg. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.9 DETERMINAÇÃO DA DL 50 MEDIANA

Na dose de 300 mg/kg, nenhum dos animais apresentou mortalidade nas primeiras 24 horas após a administração da dose única de PLPp, nem durante os 14 dias de duração da avaliação. Entretanto, observou-se que os camundongos apresentaram alguns sinais de toxicidade (Quadro 1). Na primeira meia hora os animais estavam letárgicos, com diminuição da atividade geral, andavam com dificuldade e arrastando as patas traseiras (trem posterior), tinham redução da resposta aos reflexos auricular e corneal, assim como a estímulos como toque, aperto de cauda e ao reflexo de endireitamento. Demonstraram ainda a existência de irritabilidade, ptose, piloereção, hipotermia e respiração ofegante. A maioria desses sinais observados cessou após a segunda hora de avaliação, com exceção da ptose que esteve presente até a terceira hora, da piloereção que persistiu até a sétima hora e a hipotermia que foi presente até a oitava hora. A irritabilidade, no entanto, permaneceu presente até o 14º dia.

Também não foi observada mortalidade durante os 14 dias de avaliação nos animais tratados com 2000 mg/kg de PLPp. Porém foi observado que os camundongos apresentaram alguns sinais de toxicidade (Quadro 1). Após meia hora de avaliação os animais se apresentaram letárgicos, com diminuição da atividade geral, andando com dificuldade e arrastando as patas traseiras (trem posterior), com redução da resposta aos reflexos auricular e corneal, diminuição de estímulos como toque e aperto de cauda, ao reflexo de endireitamento e força para agarrar. Demonstraram ainda a ocorrência da cauda ereta, ptose, diarreia, piloereção, hipotermia e respiração ofegante. A maioria desses sinais cessou após 24 horas com exceção da cauda ereta que foi presente em apenas um animal até o 11º dia, da piloereção que permaneceu até o 13º dia, e da irritabilidade que foi observada até o 14º dia. Após o primeiro dia observou-se a ausência do reflexo auricular em todos os animais até o final do período proposto. Assim como foi notado a ausência de reflexo corneal em um animal até o último dia de acompanhamento. A lacrimação foi observada em um animal no 13º dia.

Tabela 4. Efeitos da administração intraperitoneal de doses únicas (300 e 2000 mg/kg) de proteínas do látex de *Plumeria pudica* em camundongos.

Dose mg/kg	M/T*	Tempo	Sintomas
0	0/3		Nenhum
300	0/3	30 min 2h	Letargia, diminuição da atividade geral, dificuldade de locomoção, redução da resposta aos reflexos auricular e corneal, diminuição de estímulos como toque e aperto de cauda, ao reflexo de endireitamento e força para agarrar, irritabilidade, ptose, piloereção, hipotermia e respiração ofegante.
		3h	Ptose (1 animal)
		7h	Piloereção
		8h	Hipotermia
		14° dia	Irritabilidade
2000	0/3	30 min 24h	Letargia, diminuição da atividade geral, dificuldade de locomoção, redução da resposta aos reflexos auricular e corneal, diminuição de estímulos como toque e aperto de cauda, cauda ereta, ptose, diarreia, piloereção, hipotermia e respiração ofegante.
		11 ° dia	Cauda ereta (1 animal)
		13° dia	Lacrimação e piloereção
		14° dia	Irritabilidade e ausência de reflexo auricular e reflexo corneal (1 animal)

*M/T= número de camundongos mortos/número de camundongos tratados.

5.10 ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÁTEX DE *Plumeria pudica*

A análise proteômica por espectrometria de massa revelou a presença de 20 proteínas. Dentre todas as proteínas identificadas estão: peroxidases, endoquitinases, quitinas, proceraína B, taumatinas, 1-3 endo beta-glucanases e proteases cisteínicas. Além da presença de proteína relacionada a patogênese 4 e proteína ribonuclease H, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 5. Lista de Proteínas identificadas no látex de *Plumeria pudica* por espectrometria de massa.

Banda	Acesso	Proteína e nome do organismo	Massa Molecular (Da)	Score da Proteína	Sequência Peptídica
1	XP_006359049	Peroxidase <i>Solanum tuberosum</i>	39395	109	KYYVDLMNRQ RIVSCSDIAALAARD
2	Q41596	Endoquitinase 1 <i>Theobroma cacao</i>	35794	70	RFDQMLLHRN
3	KHN14941	Endo-beta-1,3- glucanase <i>Glycine soja</i>	39693	115	RDISLDYALFRS KAGGGSLNIVVSESGWPSSGGTATSLDNAR
	KYP77074	Ribonuclease H <i>Cajanus cajan</i>	32247	62	KLNC DGAVADNVRA
4	XP_011083774	Endo-beta-1,3- glucanase <i>Sesamum indicum</i>	37988	72	RIYDPHQPTLQALRG RAIETYIFAMFDENQKNPEYEKH
5	KHN05804	Vignain <i>Glycine soja</i>	32359	60	KVGSVPPSVDWRK
6	AHX59270	Proceraina B <i>Calotropis procera</i>	39060	134	RSGVFSGACGPRV RMIALSEQELDCERT
	XP_006367558	Endo-bta-1,3-glucanase <i>Solanum tuberosum</i>	39110	58	RVDHAVNIVGYGSEGGVNYWIVRN KYIAVGNEVDPVKF
7	XP_003550321	Protease Cisteinica <i>Glycine max</i>	53279	74	KLPDSVDWRK
8	ALA55569	Taumatina <i>Cryptostegia grandiflora</i>	22948	218	RTNCNFDGAGRG RAPGGCNPCTVFKT KDDPTSTFTCPGGTNYRV RLNSGQTWTINVAPGTAGARI
9	KHG16133	Endoquitinase 1 <i>Gossypium arboreum</i>	35711	82	RETFNQMLLHRN RVPGYGVITNIINGGLECGKG
10	XP_006340814	Endoquitinase básica <i>Solanum tuberosum</i>	29257	107	KWRPTGADLSAGR
11	KHG16133	Endoquitinase 1 <i>Gossypium arboretum</i>	35711	125	RETFNQMLLHRN RVPGYGVITNIINGGLECGKG
12	KDO71433	Quitina tipo 1	36082	170	KSFGAFGTTGDTDRK

		<i>Citrus sinensis</i>			RLPGYGVVTNIINGGIECGKG
13	KDO71433	Quitina tipo 1 <i>Citrus sinensis</i>	36082	144	KSFGAFGTTGDTDTRK RLPGYGVVTNIINGGIECGKG
14	OAY70879	Protease Cisteinica Específica de Senescência <i>Ananas comosus</i>	37802	96	KNSWGTTWGENGYMRI
15	AGI59309	Proceraina B <i>Calotropis procera</i>	24187	74	LPNSVDWRE
16	KDO71433	Quitina tipo1 <i>Citrus sinensis</i>	36082	144	KSFGAFGTTGDTDTRK RLPGYGVVTNIINGGIECGKG
17	OAY70879	Protease Cisteinica Específica de Senescência <i>Ananas comosus</i>	37802	83	KNSWGTTWGENGYMRI
18	AMY15659	Proceraina <i>Calotropis procera</i>	38739	162	KGVVFPIN RSGVFSGACGPRV RVDHAVNIVGYGSEGGVNYWIVRN
19	AHX59270	Procerain B <i>Calotropis procera</i>	39060	251	RSGVFSGACGPRV RMIALSEQELDCERT REKYPYIFQQGCYQKE RTSYGCKGGYYTDAFAYVAKK RVDHAVNIVGYGSEGGVNYWIVRN
20	AIE39008	Proteina Relacionada a Patogênese 4 <i>Vaccinium virgatum</i>	14914	77	RIVDQCSNGGLDL DAGVFKQ

6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais e seus derivados tem sido vastamente utilizadas como alternativa aos medicamentos alopáticos em todo o planeta (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Porém, apesar da alta aceitação do uso de plantas medicinais pela população, estudos que avaliam as propriedades tóxicas dessas plantas ainda são considerados escassos (ALMEIDA *et al.*, 2014). Sendo assim, essa avaliação é necessária para determinar a toxicidade de produtos e estabelecer critérios para selecionar uma dose segura (FARSI *et al.*, 2013).

Na tentativa de estudar as propriedades farmacológicas e seus potenciais tóxicos o látex de *P. pudica* foi fracionado, e avaliado quanto à presença dessas características na fração obtida. A fração proteica do látex foi escolhida como alvo da análise devido à sua solubilidade aquosa e por ser destituída de borracha. Além de previamente ter apresentado atividades como antinociceptiva e antiinflamatória (FERNANDES *et al.*, 2015) e antidiarreica (SANTANA *et al.*, 2018). Esses estudos por sua vez, contribuíram ainda para a caracterização e identificação inicial das moléculas ativas consideradas de natureza proteica. Por conseguinte, seria então de grande interesse, a avaliação toxicológica dessa fração.

O peso corporal é um dos critérios mais utilizados para indicar o surgimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (GONZÁLEZ & SILVA, 2003; PIRES-JÚNIOR *et al.*, 2012, BARBOSA, 2014). Em relação ao peso corporal dos animais tratados com PLPp na dose de 40mg/kg não se observou qualquer alteração significativa em relação a este parâmetro tanto para avaliação aguda quanto para a avaliação subcrônica (Figura 3). Demonstrando desta forma que o tratamento não afetou o metabolismo ou a absorção de nutrientes dos animais, já que nestes, durante o período de experimentação não houve uma tendência de perda de peso corporal. Tais dados são semelhantes aos encontrados por Pinheiro (2012) ao utilizar 50 mg/kg de uma fração proteica do látex de *Plumeria rubra* por via endovenosa para avaliação de sua toxicidade e diferem dos encontrados por Bezerra *et al.* (2017) com uma fração proteica obtida do látex de *C. procera* administrada por via intraperitoneal na dose de 75 mg/kg, no qual os animais tiveram uma significativa perda de peso nos primeiros dias de avaliação.

Outros sinais de toxicidade também normalmente avaliados podem ser expressos pelas alterações hematológicas e bioquímicas, além da alteração da massa relativa dos

órgãos (GONZÁLEZ & SILVA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A avaliação hematológica, por exemplo configura-se como uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos animais e muitas vezes são descritas na literatura por ter alta correlação em prever toxicidade humana. Portanto, alterações no sistema hematológico em mamíferos por determinadas substâncias também são encontradas em humanos na maioria das vezes (OLSON *et al.*, 2000).

O leucograma é composto pela contagem total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos (KERR, 2003). Poucas vezes é considerado patognomônico em determinada doença, no entanto as informações fornecidas como a contagem, características morfológicas, proporções relativas, maturação e modificações relacionadas a inflamação podem ser pertinentes para compor o diagnóstico diferencial, para a avaliação da gravidade da doença e o fornecimento do prognóstico (LATIMER & MEYER, 1992; ALVARENGA, 2012). De maneira geral, não foi observada variação significativa na contagem total e diferencial de leucócitos dos grupos tratados com PLPp durante a avaliação aguda e a subcrônica em relação aos seus respectivos controles (Tabela 1). Pinheiro (2012) e Bezerra *et al.* (2017) ao realizarem essa avaliação em seus respectivos estudos com os látices de *P. rubra* e *C. procera* não observaram alterações significativas em comparação com seus respectivos controles assim como foi visto para a fração PLPp.

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 2), as provas de função hepática despertam interesse, uma vez que diversas substâncias são biotransformadas pelo fígado. Para a clínica dos pequenos animais geralmente são encontradas irregularidades nas atividades séricas das enzimas hepáticas, as quais são consideradas indicadores sensíveis de alterações hepatobiliares. Um aumento nas atividades séricas enzimáticas podem estar relacionadas a modificações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, indução de enzimas ou lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular. Processos considerados patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, relacionadas à variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático (SHARON & CENTER, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 2007; LUNGUINHO, 2012)

As enzimas AST e ALT encontram-se no citossol das células hepáticas (SHAHJAHAN *et al.*, 2004). Lesões que afetem a integridade estrutural dos tecidos geralmente são refletidas com uma elevação de uma dessas enzimas no soro. As concentrações de AST no grupo que foi tratado com PLPp 40 mg/kg durante 10 dias

relacionados a avaliação da toxicidade aguda revelaram um aumento significativo em comparação com o controle salina, porém nota-se que com a continuação do tratamento esse valor reduziu significativamente, como pode-se observar no resultado apresentado pelo grupo experimental referente a avaliação subcrônica. Estes dados demonstram a reversibilidade de possíveis efeitos tóxicos indica a capacidade de reação do organismo ao receber a fração (EATON; KLAASSEN, 1996).

Já os níveis de ALT nos grupos que foram avaliados para toxicidade aguda e subcrônica não apresentaram diferença significativa em relação aos seus respectivos grupos controles. A enzima ALT elevada indica um dano mais específico no fígado, porém reduzida não tem correlação aparente com alterações fisiopatológicas (OLIVEIRA, 2012). Conforme MOTTA (2003), AST e ALT são enzimas encontradas em altas concentrações no músculo, fígado e cérebro, e a elevação da sua atividade no sangue pode estar relacionada a necrose nesses tecidos. Contudo, a ausência de lesão microscópica no fígado permite inferir que o aumento de AST não é decorrente de injúrias no tecido.

A alteração da função renal é uma das consequências mais comuns de toxicidade decorrente da excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos (HENRY, 2008). Desta forma, ao ocorrer falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, especialmente substâncias nitrogenadas, se concentram levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos. Danos ao fígado e rins frequentemente resultam em aumento clínico das enzimas AST e ALT, uréia e creatinina (AKDOGAN et al., 2003). A mensuração destas, portanto, são uma importante ferramenta no diagnóstico clínico, fornecendo informações sobre o efeito patológico das substâncias sobre alguns tecidos.

Originária do catabolismo protéico, a uréia é considerada um produto metabólico nitrogenado sintetizado no fígado, resultado final da quebra de aminoácidos, normalmente transportada pelo plasma e eliminada pelos rins, na urina, compreendendo de 80% a 90% do nitrogênio urinário total excretado nos mamíferos. A creatinina é outro produto metabólico resultado da descarboxilação da creatina-fosfato no músculo e que, portanto, apresenta relação direta com a massa muscular e o metabolismo energético (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007; AFOLAYAN *et al.*, 2009).

A ausência de efeitos nesses parâmetros renais tanto para os grupos na avaliação aguda quanto para avaliação subcrônica sugere que a fração PLPp não ocasionou uma falha renal já que uma alteração na excreção desses produtos geralmente está

relacionada a uma elevação da concentração sorológica destes parâmetros (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007). Pinheiro (2012) e Bezerra *et al.* (2017) estudando efeitos toxicológicos de proteínas dos látices de *P. rubra* e *C. procera* não observaram alterações significativas para os mesmos parâmetros bioquímicos avaliados em comparação com os seus controles assim como foi visto para a fração PLPp, com exceção do resultado encontrado para o valor de AST no grupo referente a avaliação aguda.

O peso dos órgãos está relacionado de modo direto com a atividade metabólica, bem como o próprio peso corpóreo do animal. Podendo ser considerado o indicador mais sensível do efeito de um composto experimental, diferenças significativas para este fator entre animais de grupos tratados e não tratados (controle) podem ocorrer na ausência de quaisquer alterações morfológicas (BAILEY *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Em relação ao peso órgãos de grupos experimentais tratados com PLPp durante a avaliação aguda e a subcrônica, não demonstraram valores significativamente diferentes daqueles apresentados pelos grupos controles que receberam apenas o veículo salina durante estes mesmos dias (Tabela 3). Não houve mudanças significativas no peso dos órgãos fígado, rim e baço segundo a avaliação feita por Pinheiro (2012) com PLPr obtida a partir do látex de *P. rubra* e por Bezerra *et al.* (2017) com a fração proteica de *C. procera*, resultados que corroboram com o encontrado para a PLPp.

A análise histopatológica é a avaliação utilizada para determinar o tipo e a extensão da lesão de um órgão e que traz informações que dão a definição da intensidade e fase da doença, além de possibilitar o acompanhamento dos tratamentos utilizados. Para as avaliações de toxicidade de um agente químico esta é uma análise fundamental para determinar se o agente avaliado promoveu lesões nos órgãos do animal (OECD nº 420, 2001).

O estudo microscópico dos órgãos coletados para avaliação aguda da toxicidade da fração PLPp (Figura 4) não revelou alterações quando comparados ao grupo controle, tanto no fígado, quanto no baço dos camundongos tratados. Porém os animais do estudo agudo pertencente ao grupo teste, apresentaram uma leve congestão nos rins. Além disso, a ausência de alterações na concentração de ureia e creatinina sugere que a fração PLPp não promoveu lesões renais. Para a avaliação microscópica dos órgãos coletados para avaliação da toxicidade subcrônica (Figura 5) apenas o baço do grupo experimental apresentou uma leve congestão, enquanto fígado e rim mostraram-se ausentes de alterações. A presença de congestão leve, no entanto, após necropsia de

animais é um achado considerado normal, pois quando o animal morre o sangue circulante permanece no órgão (DANTAS, 2013).

Bezerra *et al.* (2017) em seu estudo também avaliaram a microestrutura dos órgãos fígado, baço e rins através de análises histológicas de animais tratados com proteínas do látex de *Calotropis procera* nas doses de 75 mg/kg e 150 mg/kg. Não foi encontrada presença de alterações morfológicas, lesões e/ou qualquer citotoxicidade nesses órgãos, sendo mantidas a organização e a arquitetura dos referidos órgão ao final dos 14 dias de avaliação para a dose de 75 mg/kg. Entretanto, ao utilizar a dose de 150 mg/kg foi observada intensa congestão vascular com hemossiderose, hemorragias intersticiais e presença isolada de células necróticas no fígado e nos rins, com maior intensidade para o fígado. O baço, porém, não foi afetado. Achados considerados indicadores de um impacto negativo relacionados ao uso dessa fração nos órgãos avaliados, e os quais não foram observados para a utilização de PLPp ao se realizar a mesma análise.

O estresse oxidativo em uma definição toxicológica baseia-se na toxidade gerada pelo acúmulo de espécies reativas ao oxigênio e a perda da capacidade antioxidante, que resulta em morte celular (LIMA, 2014). As defesas antioxidantes foram desenvolvidas para interagir com estas espécies tóxicas, no entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre as duas partes há o aumento da chance de instalação do dano oxidativo (PERADIN *et al.*, 2015). Em respeito ao nível do antioxidante GSH observou-se que não houve diferença significativa para este no fígado dos animais que passaram pela avaliação aguda e subcrônica (Figura 6). E que embora tenha se notado um aumento no grupo experimental que passou pela avaliação subcrônica este não se mostrou significante. Quanto aos rins dos animais um aumento significativo durante a avaliação aguda foi observado, com sua seguida redução no grupo referente a toxicidade subcrônica.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo tiolado contendo cisteína tida como abundante em células de mamíferos, e à qual é utilizada como substrato para as enzimas GSH transferases e peroxidases. Outras funções da GSH estão relacionadas a sua participação no armazenamento e transporte de cisteína, além da regulação do balanço redox. Deste modo a GSH é considerada o antioxidante intracelular mais importante (HALLIWELL, 2012; HALLIWELL, 2013), pois atua na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Variações nos seus níveis podem afetar diretamente a síntese de proteínas e de DNA, adicionalmente sua

oxidação ou depleção do GSH podem diminuir a síntese proteica (JORDÃO *et al.*, 1998).

Os níveis de MDA revelaram não apresentar diferença significativa entre os grupos experimentais e os grupos controles tanto para a avaliação aguda quanto para a avaliação subcrônica do tratamento com PLPp (Figura 7). Bezerra *et al.* (2017) investigando o látex de *C. procera* assim como neste estudo não encontraram diferenças significativas quando fizeram a análise desse marcador. Todos os elementos celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é uma das mais atingidas devido a peroxidação lipídica (lipoperoxidação), que ocasiona alterações na sua estrutura e permeabilidade. Deste modo, há a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, além de ocorrer a formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA). Essa produção de MDA reflete a peroxidação lipídica causada pelo dano oxidativo, assim como pode também estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (DMITRIEV & TITOV, 2010; AKINDELE *et al.*, 2015; PERADIN *et al.*, 2015).

Avaliou-se a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no fígado, rim e baço dos camundongos, como medida indireta de infiltrado neutrofílico, uma vez que esta enzima está presente, em sua forma inativa, nos grânulos destas células (DALLEGRI & OTTONELLO, 1997). Não sendo encontrado, portanto, diferença significativa entre os grupos experimentais que receberam PLPp e os grupos controles tanto para avaliação aguda como para a subcrônica (Figura 8). Os radicais livres, além de oxidarem os sistemas e membranas celulares, atuam ainda como fatores quimiotáticos, atraindo e ativando neutrófilos. Os quais por sua vez secretam enzimas proteolíticas (mieloperoxidases, elatases, proteases, etc.), sintetizam prostaglandinas e liberam mais radicais livres criando um ciclo vicioso (WELBORN *et al.*, 1991). O papel da MPO nesse processo é gerar espécies reativas do oxigênio (ROS) como parte da resposta imune inata do hospedeiro (ARNHOLD & FLEMMING, 2010).

Na bioprospecção de fitoterápicos, as doses a serem utilizadas em experimentos com animais devem ser suficientes para se observar um possível efeito adverso e estimar a DL50 (SILVA, 2015). O protocolo experimental da OECD 423 recomenda que se inicie o tratamento de três animais com a dose de 300 mg/kg. Caso se observe um ou nenhum caso de morte, deve-se repetir a dose e com a confirmação do resultado anterior, o composto deve ser testado na dose de 2000 mg/kg. Em princípio, esse

método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” (GHS).

No presente trabalho diante da mortalidade mensurada conclui-se e que a DL50 da fração PLPp de acordo com o método utilizado (OECD, 2001), se enquadram na classe 5 a qual determina que a DL50 se enquadra numa faixa de 2000-5000mg/kg. O resultado apresentado por PLPp difere daquele determinado por Bezerra (2017) que obteve uma DL50 para a fração proteica do látex de *C. procera* administrada via intraperitoneal deve está classificada na categoria 3, a qual determina que a DL50 se enquadra numa faixa de 50-300mg/kg.

Para o OECD a amostra é considerada praticamente atóxica quando apresenta um valor de DL50 acima de 2000mg/kg ou entre 2000 e 5000mg/kg. Não é aconselhado a realização do teste com a dose de 5000 mg/kg como forma de preservação a vida dos animais utilizados nos experimentos e também devido as dificuldades de solubilização e administração das amostras; com exceção de casos nos quais sejam necessários esta dosagem como forma de proteção à saúde humana.

Além da determinação de um valor de DL50, a avaliação de toxicidade clínica (*screening* hipocrático) é um recurso útil que fornece uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida sobre o estado consciente e disposição do animal, bem como sobre a atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo (LUCIO *et al.*, 2000).

Neste estudo, o *screening* hipocrático foi realizado durante o experimento de avaliação da toxicidade da fração PLPp para as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg (Quadro 1). Observou-se que a administração aguda em dose única tanto de 300 mg/kg quanto a 2000 mg/kg de PLp influenciou para o surgimento de alterações comportamentais, indicando de acordo com o período de observação (14 dias consecutivos). Tais modificações comportamentais são indicativas de que essa fração possui uma atividade no SNC depressora devido a diminuição ao reflexo de endireitamento, resposta ao toque diminuída, perda do reflexo corneal e perda do reflexo auricular. Assim como também possui uma atividade no SNC estimulante (irritabilidade), além de influenciar outras atividades fisiológicas relacionadas com o Sistema Nervoso Autônomo (como ptose, lacrimação, defecção/diarreia, piloereção, hipotermia e respiração) (Almeida *et al.*, 1999)

Bezerra et al. (2017) ao aplicar 300 mg/kg de proteínas de *C. procera* para cinco camundongos observaram a morte desses animais após 30 minutos de aplicação. Além disso, os animais ficaram bastante debilitados, letárgicos, apresentando diminuição de atividade geral, dificuldade de locomoção, ausência de respostas a estímulos como toque e aperto de cauda, sem reflexo de endireitamento, com piloereção, hipotermia e presença de contorções. Parâmetros de toxicidade que também se encontraram alterados para a administração de PLPp na mesma dose, mas que não resultaram no óbito de nenhum animal.

Por ser um fluido com diversas moléculas biologicamente ativas, o látex vegetal tem sido um importante alvo de pesquisas. Nesse contexto, as proteínas de látex de diferentes plantas surgem como uma grande promessa entre os pesquisadores uma vez que ao longo dos últimos anos, vários trabalhos foram publicados, atribuindo funções de defesa de plantas, aplicações biotecnológicas e farmacológicas, além de estudos ecológicos e evolucionários para o látex (VIANA, 2015). Com o intuito de avançar no processo de caracterização das proteínas presentes no látex de *P. pudica* uma análise por espectrometria de massas foi realizada e um total de 20 proteínas foram identificadas. Dentre as proteínas detectadas, pode-se citar a presença de: peroxidase, endoquitinases, quitinas, taumatina, 1-3 endo beta-glucanases e proteases cisteínicas, proteína de patogênese 4 e ribonuclease H (Tabela 4).

O látex de *P. pudica* segundo Fernandes (2015), contém, principalmente, proteínas com massas moleculares variando de 14,0 a 45,0 kDa. Neste mesmo estudo, a fração PLPp por meio de ensaios com diferentes substratos para detecção de proteínas enzimáticas indicou a presença de proteases cisteínicas, serínicas e quitinases resultados corroborando com os achados obtidos neste trabalho após a realização da análise proteômica por espectrometria de massa. Em termos comparativos, 212 proteínas foram identificadas no látex de *C. procera*, com massas moleculares de 10 a 113 kDa; em *P. rubra* foram identificadas 118 proteínas (12 a 117 kDa); *Cryptostegia grandiflora* 196 proteínas (10 a 75 kDa) (FREITAS *et al.*, 2010, 2007).

Cruz (2015) em um estudo proteômico do látex de *Thevetia peruviana* demonstrou a presença de proteínas com massas moleculares em torno de 28 a 100 kDa e ainda um total de 33 proteínas identificadas. Dentre as proteínas detectadas, pode-se citar inibidores de proteases, proteases cisteínicas, osmotinas, peroxidases, fosfotransferases, e proteínas de reserva. Mostrando uma relação de proteínas também vistas para o látex de *P. pudica* e as quais têm sido encontradas em vários fluidos

laticíferos normalmente associadas a defesa vegetal, ação evidenciada principalmente, pela presença de glucanases e quitinases (AGRAWAL; KONNO, 2009). Além disso, o látex de *P. pudica* demonstrou contar com isoformas de proteases cisteínicas corroborando o fato de que fluidos laticíferos são reconhecidos por conter pelo menos uma protease em sua composição e que essas biomoléculas geralmente compõem as principais enzimas endógenas presentes nesses fluidos (DOMSALLA & MELZIG, 2008).

Bezerra *et al.* (2017) mediante aos resultados obtidos para avaliação de toxicidade por via intraperitoneal do látex de *C. procera*, investigaram, se os efeitos tóxicos atribuídos às doses administradas estariam relacionados com a atividade das proteases cisteínicas. Para isso foram realizados mais dois experimentos independentes, sendo a dose de 75 inibida com iodoacetamida (IAA) e outro experimento utilizando os picos cromatográficos PI e PII, na dose de 75 mg/kg, com PII inibido com iodoacetamida. Foram avaliadas as atividades de PL- PI e PL-PII os quais são picos obtidos por cromatografia da fração PL. PL-PI é constituída por uma mistura de quitinases (FREITAS *et al.*, 2016), portanto não apresenta atividade proteolítica, enquanto PL-PII apresenta alta atividade proteolítica (RAMOS *et al.*, 2012) por esta razão foi inibida com iodoacetamida, substância que promove a inibição de proteases cisteínicas.

Em ambos experimentos, nenhum animal foi a óbito e os sintomas tóxicos apresentados pelos referidos grupos foram mais brandos em relação as doses administradas anteriormente. Confirmando desta forma que a hipótese de que a atividade proteolítica pode ser uma das causas de óbito e das alterações dos parâmetros comportamentais. Tanto a sub-fração PI como PII com IAA alteraram o peso dos animais de forma negativa, sugerindo que além das proteases outras substâncias podem conferir certo grau de toxicidade às amostras de látex de *C. procera*. Para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, não foi observada diferença significativa dos animais tratados com as sub-frações. Em relação a avaliação macroscópica dos órgãos vitais, peso relativo e avaliação microscópica os diferentes tratamentos (PL-PI, PL-PII, 75 mg/kg IAA) demonstraram baixa toxicidade. Tendo como achados para a avaliação microscópica: degeneração hidrópica no fígado (PL-PI), retração da cápsula de Bowman, alterações na estrutura glomerular e células necróticas nos rins para a PL 75 IAA.

Esses dados sugeriram que o maior potencial de toxicidade se encontra na fração da borracha conforme o previamente descrito por outros autores. Além disso, foi visto que por via intraperitoneal apresentou alta toxicidade devido principalmente a atividade proteolítica da amostra (BEZERRA *et al.*, 2017). Proteases também estão presentes na fração PLPp e podem assim como o visto por *Bezerra et al.* (2017) podem estar relacionada as alterações toxicológicas encontradas após a administração da fração PLPp em camundongos.

A ampla composição molecular dos fluidos lactíferos impede a detecção exata dos compostos tóxicos. Embora não haja a completa identificação das moléculas ativas envolvidas nos eventos tóxicos, o processo de fracionamento do látex íntegro pela solubilidade e massa molecular de seus constituintes contribui de maneira expressiva para caracterizar suas frações, assim como para assinalar a direção a ser seguida na purificação dos princípios ativos (AGUIAR, 2006).

Apesar de relatos do uso da planta *Plumeria pudica*, dos progressos no processo de purificação das proteínas do látex e na descrição de suas propriedades funcionais e moleculares, não existe até o momento, de acordo com pesquisa bibliográfica realizada, estudos que relacionem a maioria dessas proteínas identificadas com mecanismos de toxicidade. Portanto, parte da toxicologia das proteínas do látex vegetal permanece não determinada. Situação contraditória, uma vez que a literatura as assinala como candidatas a serem responsáveis por diversas propriedades farmacológicas conhecidas para o látex.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com a fração proteica PLPp não foi capaz de alterar parâmetros relacionados a toxicidade como peso corporal dos animais, peso dos órgãos avaliados e contagem total e diferencial de leucócitos. Em relação aos exames bioquímicos não houve alteração para ALT, ureia e creatinina, porém observou-se um aumento para AST para o grupo pertencente a avaliação aguda.

O rim dos animais tratados durante a toxicidade aguda com PLPp apresentaram valor significativamente maior de GSH do que aqueles que não receberam a fração. No tocante a MDA e MPO, não foram observadas diferenças entre os grupos. A análise histopatológica revelou a presença de leve congestão no rim e no baço dos animais da avaliação aguda e subcrônica.

PLPp ainda promoveu alterações comportamentais que afetaram parâmetros do Sistema Nervoso Central e Autônomo assim como a coordenação do sistema motor e os reflexos. Devido à ausência de mortalidade a DL50 foi estimada em superior a 2000 mg/kg. A análise proteômica demonstrou a presença de proteases cisteínicas, quitinases, peroxidases, glucanases, proteína relacionada a patogênese 4, as quais têm sido encontradas em vários fluidos laticíferos.

Portanto, PLPp pode ser considerada um material promissor para a exploração de novas moléculas que apresentam atividades biológicas interessantes. Embora a identificação de moléculas individuais envolvidas nos efeitos almejados continue mostrando-se como o caminho a ser seguido.

8 REFERÊNCIAS

AFOLAYAN, A. J.; YAKUBU, M.T. Effect of *Bulbine natalensis* barker stem extract on the functional indices and histology of the liver and kidney of male Wistar rats. **J. Med. Food.**, v.12, n.4, p. 814-820, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Edição 2. Brasília- DF. 2013.

AGRA, M.; FREITAS, P.F.; FILHO, J. M. B. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.** 17(1): Jan./Mar. 2007

AGRA, M.F.; BARACHO G.S; NURIT K; BASÍLIO I. J. L.D; COELHO V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **J Ethnopharmacol** doi:10.1016/j.jep.2006.12.007.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.

AGUIAR, V. C. **Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.** 2006. 156f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLS, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro and 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.

ALENCAR, N. M. N; *et al.* The Preventive Effect on Ethanol-Induced Gastric Lesions of the Medicinal Plant *Plumeria rubra* : Involvement of the Latex Proteins in the NO/cGMP/K_{ATP} Signaling Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online), v. 2015, p. 1-10, 2015.

ALMEIDA, R. N. *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3-4, p. 72-76, 1999.

ALVARENGA, L. F. **Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis*.** 2012. 168f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

AKDOGAN, M.; KILINC, I.; ONCU, M.; KARAOZ, E.; DELIBAS, N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha spicata* L on kidney tissue in rats. **Human and Experimental Toxicology**. v.22, p. 213-219, 2003.

AOKIA, Y. ; TAKAHASHIA, S.; TAKAYAMAB, D.; OGATAC, Y.; SAKURAIC, N.; SUZUKIC, H.; ASAWATRERATANAKULB, K.; WITITSUWANNAKULE, D.; WITITSUWANNAKULF, R.; SHIBATAC, D.; KOYAMAB, T.; NAKAYAMAA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 225, p. 1–8, 2014.

ARAÚJO, E S. **Látex de *Plumeria rubra* L (Jasmim): Perfil Proteico, perfil enzimático e ação contra insetos.**2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ARNHOLD, J.; FLEMMING, J. Humam myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 500, p. 92-106, 2010.

ARYA, S; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of latex of *Calotropis procera* against diferente mediators of inflammation. 2005; **4**: 216-20.

ASSIS, C. S. **Avaliação dos Efeitos Tóxicos In Vitro e In Vivo do Extrato Hidroetanólico dos Frutos de *Genipa americana* L. Rubiacaceae em Camundungos Swiss.** 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BAGHEL, A. S; MISHRA, C. K.; SASMAL, A. R.; NEMA, R. K. Antibacterial activity of *Plumeria rubra* Linn. plant extract. **J. Chem. Pharm. Res.**, 2010, 2(6):435-440.

BARBOSA, C. E. S. Avaliação da Toxicidade Oral Aguda e da Atividade Antitumoral in vivo do Látex e Extratos de ima Apocynaceae de Uso Popular. **Vita et Sanitas**, Trindade-Go, n.08, jan-dez./2014.

BEZERRA. C. F. **Propriedades Toxicológicas e Imunomoduladoras de Proteínas Laticíferas de *Calotropis Procera*.**143f. 2017.Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BEZERRA, S. B. **Avaliação Da Segurança e Eficácia Farmacológica Não clínica das Gotas Arthur de Carvalho®: Validação do Uso Medicinal nos Distúrbios Gastrintestinais.** 2015. 162f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BEZERRA, C. F.; MOTA, E. F; SILVA, A. C. M.; TOMÉ, A. R.; SILVA, M.Z.R.; BRITO, D.; PORFÍRIO, C. T. M. N, OLIVEIRA, C. A, LIMA-FILHO, J. V.; RAMOS, M. V. Latex proteins from *Calotropis procera*: Toxicity and immunological tolerance revisited. **Chemico-Biological Interactions** 274 (2017) 138-149.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with anenzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology** 78, 206-209, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 90 de 16 de março de 2004.** Dispões sobre o “Guia para estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos”. Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília, DF.2004.

BRASIL. Ministério da Educação. **Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e anti-Inflamatória de produtos naturais.** Boletim Técnico - N.º 97 - P. 1-35.Lavras, MG. 2014.

BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M.; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 11, p. 52-58, 2011.

BINDHU, O. S.; SINGH, M. K. Hemostatic, milk clotting and blood stain removal potential of cysteine proteases from *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, p. 350–356, 2014.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados.** 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

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

BROWN, S. H. *Plumeria pudica*. **Bridal Bouquet, Fiddle Leaf *Plumeria*.** University of Florida. Disponível em: <<http://lee.ifas.ufl.edu/Hort/GardenPubsAZ/PlumeriaPudica.pdf>>. Acesso em: 22 jun 2017.

BUSH, B.M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais.** Rio de Janeiro:Roca, Caps 5,6 e 7, 2004

BUSHMAN, B. S.; SCHOLTE, A, A. A.; CORNISH, K.; SCOTT, C, D. J.; BRICHTA, J. L.; VEDERAS, D, J. C.; OCHOA, O.; MICHELMORE, R. W.; SHINTANI, D. K.; KNAPP, S. J. Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. **Phytochemistry**. v. 67, p. 2590–2596. 2006.

CHANDA, I.; BASU, S. K.; DUTTA, S. K.; DAS, S. R. C. A protease isolated from the latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 1: purification and characterization **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 705-711, 2011.

CALIXTO. J. B.; JARBAS, M. S. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CANAVEZE, Y. **Estrutura, Origem e Desenvolvimento De Laticíferos e Coléteres em Plantas de *Tabernaemontana catharinensis* A.Dc. (Rauvolfioideae,**

Apocynaceae) Em Diferentes Fases Do Desenvolvimento Vegetativo. 2012. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista Botucatu.

CARVALHO, L. S. **Efeito depressor e toxicidade do extrato etanólico da casca de *Aspidosperma subincanum* (Apocynaceae) em camundongos.** 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

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.

CHOUDHARY, M.; KUMAR, V.; SINGH, S. Phytochemical and Pharmacological activity of *Genus Plumeria*: An updated review. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 5, p. 266–271, 2014.

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

CORNELIUS, M. T. F. **Atividades biológicas e identificação dos constituintes químicos das espécies vegetais: *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. (Apocynaceae) e *Solanum crinitum* Lam. (Solanaceae) e identificação da acetanilida exsudada por *Xenohyla truncata* (Izecksohn, 1998).** Seropédica, 2006. 287 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

COSTA, B. A.; ROBAINA, A. D.; PEITER, M. X.; FERRAZ, R. C.; SCWAB, N.T; SOUZA, G. R. C.; PINTO, L. M. Systemic and reproductive toxicity induced by *Parkia platycephala* ethanolic extract in female Wistar rats. **Rev Bras Farmacogn** 23(2013): 920-926.

COSTA, L. J. L. **Avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatória e antiulcerogênica do extrato seco obtidos por aspersão de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess e sua toxicidade reprodutiva em ratas Wistar.** 2010.70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

COURA, C.O.;ARAFFLJO, I. W. F; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.;QUINDER, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES., N. M.B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulfate polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. 2012. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 110:335–341.

CRUZ, S. M.; ANGELIS, L. H. Alternativas aos testes de segurança de cosméticos em animais. **Pós Em Revista Do Centro Universitário Newton Paiva.** 1/2012 - EDIÇÃO 5.

DANTAS, D. M. **Toxicidade Aguda e Subaguda do Radiofármaco 18F-FDG**. 2013. 166f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflamm. Res.**, v.46, p.382-91, 1997.

DAS, B. B.; FERDOUS, T.; MAHMOOD, Q. A.; HANNAN, J.M.A.; BHATTACHARJEE, R.; DAS, B. K. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the bark extract of *Plumeria rubra* on laboratory animals. **European Journal of Medicinal Plants**, v.3, p. 114-126, 2013.

DEVARAJ, K. B.; GWODA L. R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). **Phytochemistry**, v. 69, p. 647–55, 2008.

DEVPRAKASH T. R.; GURAV, S.; KUMAR G.P, S.; MANI, T. T. An review of phytochemical constituents and pharmacological activity of *Plumeria* species. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 4. 2012.

DMITRIEV, L.F.; TITOV, V.N. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v.9, n.2, p.200-210, 2010.

DOMSALLA, A; MELZIG, M.F. Ocurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.**, v74, p 699-711,2008.

DUSSOURD, D.E. Foraging with finesse: caterpillar adaptations for circumventing plant defenses. In: Stamp, N.E., Casey, T.M. (Eds.), *Caterpillars*. **Chapman and Hall**, New York, p. 92-131, 1993.

FABBRO, L. **Avaliação do Efeito do Flavonoide Crisina na Toxicidade Induzida pela Zearalenona em Camundongos**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em em Bioquímica). Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana.

FREITAS, C. D. T.; CRUZ, W. T.; SILVA, M. Z. R.; VASCONCELOS, I. M.; MORENO, F. B. M. B.; MOREIRA, R. A. MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; ALENCAR, L. M. R.; SOUSA, J. S.; ROCHA, B. A. M.; RAMOS, M. V. Proteomic analysis and purification of an unusual germin-like protein with proteolytic activity in the latex of *Thevetia peruviana*. *Planta*, v. 243, p. 1115–1128, 2016.

FREITAS, C. D. T.; SILVA, M. Z. R.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; RAMOS, M.V. New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. *Plant Physiology and Biochemistry* 96, 45-52, 2015.

FREITAS, C. D.T; ARAÚJO, E. S.; CAVALHEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L. S.; RAMOS, M. V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer

cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. Brazilian Society of Plant Physiology, v. 22, n. 1, p. 11–22, 2010.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R.; MACEDO, N. M.; SALES, M. P.; VILLA-BOAS, L. A.; RAMOS, M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 45, p. 781-789, 2007.

FERNANDES, H. B. **Caracterização Bioquímica de Proteínas do Látex de *Plumeria Pudica* (Jacq., 1760) e seu Potencial Anti-Inflamatório e Antinociceptivo.** 2014.87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí, Parnaíba.

FERNANDES, H. B.; MACHADO, D. L.; DIAS, J. M.; BRITO, T. V.; BATISTA, J. A.; SILVA, R. O.; PEREIRA, A. C. T. C.; FERREIRA, G. P.; RAMOS, M. V.; MEDEIROS, J. V. R.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; BARBOSA, A. L. R.; OLIVEIRA, J. S. 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, p. 269–277, 2015.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. Fitoterapia No Mundo Atual. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 9, 1829, 2010.

FINN, M. A.; STARK, J. F. Medical science and the Cruelty to Animals Act 1876: A re-examination of anti-vivisectionism in provincial Britain. **Stud Hist Philos Biol Biomed Sci**. 2015. Feb;49: 12-23.

FIORILLO, F; PALOCCI, C.; SIMONETTA, S; PASQUIAG. Latex lipase of *Euphorbia characias* L.: na especific acylhydrolase with several isoforms. **Plant. Sci.**, v. 172, p. 722-727,2007.

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

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

GU, X.; SIEMAN, E.; ZHU, L.; GAO, S.; WANG, Y.; DING, J. Invasive plant population and herbivore identity affect latex induction. **Ecological Entomology**, v. 39, p. 1-9, 2014.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; GOMATHI, P.; THAMIL, V. Anti-inflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, p. 1472-6882. 2006.

GUPTA, M.; MAZUMDER, Uk; GOMATHI, P. Evaluation of antipyretic and antinociceptive activities of *Plumeria acuminata* leaves. **J Medical Sci**. v. 7,p. 835-839. 2007

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 631–39, 2008.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, Barry. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637-644, 2013.

HARKNESS, S. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e Clínica de coelhos e roedores**, 3. ed., São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1993, 238p.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

JORDÃO, A. A. J.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, 31: 434-449, jul./set. 1998.

JUCÁ, T.L.; RAMOS, M.V.; MORENO, F.B.M.B.; MATOS, M.P.V.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; MOREIRA, R.A.M.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. Insights on the Phytochemical Profile (Cyclopeptides) and Biological Activities of *Calotropis procera* Latex Organic Fractions. **The Scientific World Journal**, 2013.

JUNIOR, L. R. A.; GARCEZ, F. R.; GARCER, W. S. Pregnanos E Outros Constituintes Das Raízes De *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 4, 519-523, 2013.

KERR, M. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária –Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

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

KONNO, K., HIRAYAMA, C., SHINBO, H., NAKAMURA, M. Glycine addition improves feeding performance of non-specialist herbivores on the privet, *Ligustrum obtusifolium*: in vivo evidence for the physiological impacts of anti-nutritive plant defense with iridoid and insect adaptation with glycine. **Appl. Entomol. Zool.** 44, 595–601. 2009.

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

KUIGOU, G.M; KOUAM, S.F.; NGADJUI, B. T; SCHULZ, B.; GREEN, I.I.; CHOUDHARY, M.I.; KROHN, K. Minor secondary metabolic products from the stem

bark of *Plumeria rubra* Linn. Displaying antimicrobial activities. **Planta Med.**; v.76, p. 620-625,2010.

KUMAR, V. L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M. V.; MOHAN, M.; MATOS, M. P. V. Protective effect of proteins derived from the latex of *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthriticrats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1336–1341. 2011.

LARA, P. G. **Efeito do Veneno de *Tityus Serrulatus* em Camundongos Selecionados Geneticamente para Máxima ou Mínima Resposta Inflamatória**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Universidade de São Paulo, São Paulo.

LATIMER, K.S.; MEYER. D.J. **Os leucócitos na Saúde e na Moléstia**. In: **ETTINGER, S.J.** Tratado de medicina Interna Veterinária. 3.ed. São Paulo: Manole, 1992. V. 4, p. 2616- 2664.

LIMA, C. S. **Estudo da Toxicidade Não Clínica em Ratos Submetidos ao Tratamento com Óleo-resina de *Copaifera duckei Dwyer* (SUBCRÔNICO E REPRODUTIVO)**,2014. 266f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá. Macapá. 2014.

LOEB, W. F.; QUIMBY, F. W. **Clinical chemistry of laboratory animal**. 2th ed. Philadelphia: Taylor & Francis; 1999.

LUCETTI, D. L. **Avaliação das atividades antiinflamatória e antinociceptiva do acetato de lupeol Isolado de *Himatanthus drasticus* (MART.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba)**,2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. N. H.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 1-11. 2010.

LUNGUINHO, D. M. **Estudo dos Efeitos Antitumorais e Toxicológicos do óleo Essencial das Folhas de *Xytopia frutescens* Aubl. (Annoceae)**. 2012. 137f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

LUZ, P. B. **Fração Proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (AIT). R. Br. reduz hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos: mecanismos e mediadores envolvidos**. 2012.85f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MALONE, M. H., ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natura products -General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol** 8: 127-147, 1983.

MARANHÃO, H. M. L. **Avaliação Toxicológica Reprodutiva da Resina de *Aloe ferox* Miller em Ratos Wistar**. 2010.57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MARANHÃO, H. M. L. **Atividades Anti-Inflamatória, Antiulcerogênica, Hepatoprotetora e Segurança De Uso Do Extrato Aquoso da Casca do Caule de *Simarouba Amara* Aublet (Simaroubaceae)**. 2014.117f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MARIZ, S. R. **Estudo Toxicológico Pré-Clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 2007. 191f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MARQUES, L. M. **Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por etanol: envolvimento da via NO/GMPc/KATP e da glutathiona**. 2012. 126f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MARTINS, M. C.; GARLET, T. M.B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental Santa Maria**, v. 20, n. 1, jan.-abr. 2016, p. 438–448.

MESQUITA, A.C; OLIVEIRA, L. E. M. Características anatômicas da casca e produção de látex em plantas de seringueira não enxertadas. **Acta Amazônia**. vol. 40(2) 2010: 241 – 246.

MILANINO, R; BUCHNER, V. Copper: role of the endogenous and exogenous metal on the development and control of inflammatory processes, **Rev. Environ Health**. 21(2006) 153-215.

MORAIS, J. A. **Toxicidade Aguda e Crônica do Chá Ayahuasca (*Banisteriopsis Caapi* e *Psychotria Viridis*), por Análise Histológica em Ratas Wistar**.2014. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. São Paulo: Robe, 2003. 400p.

MONTEIRO, M.C.S.A. **Efeitos Cardiovasculares e Renais de uma Fração Proteica Isolada do Látex de *Calotropis procera***. 2015. 106f. Tese Doutorado em (Fisiologia e Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MOURA, N. S; VASCONCELLOS, A. C. M.; BARNABÉ, B. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H. Ensaio Toxicológicos: Um Estudo Sobre a Utilização de Testes *In Vivo* e *In Vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2012.

NELSON, S. *Plumeria Rust*. College of Tropical Agriculture and Human Resources, **Plant Disease**, v. 61, p. 1-6. 2009.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents** (Guideline 407). Paris, 2008.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Acute Oral Toxicity Fixed Dose Procedure** (Guideline 420). Paris, 2001.

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

OLIVEIRA, C. R. **Estudo da atividade antiinflamatória intestinal de *Strychnos pseudoquina* ST. Hil (falsa quina) em modelos experimentais de inflamação intestinal**. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical). Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

OLIVEIRA, J. M. G.; PEREIRA, L. J. C. ; MOURA, E. R. ; SOUSA, M. R. S. C. ; SALES, P. A. B. ; SILVA, S. M. M. S. ; LIRA, S. R. S. ; COSTA, A. P. R. Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* sobre o ciclo estral de ratas Wistar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.2, p.539-546, 2016.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização bioquímica e atividade citotóxica *in vitro* e antitumoral *in vivo* de proteínas do látex de *Calotropis procera***. Fortaleza, 2011. 153 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal do Ceará. 2011.

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, M. G. C.; NUNES, T. L.; PAIVA, A. L. C.; BEZERRA, T. C. G.; FERNADES, N. S.; VALE, A. M.; JUNIOR, R. A. B.; PAULA, V. V. Aspectos hematológicos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no Rio Grande do Norte1. **Pesq. Vet. Bras.** 32 (Supl.1):4-8, dezembro 2012.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Macapá**, v. 6, n. 1, p. 20-25, 2016.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v.32, p.56-67, 2000.

PATEL, A.K; SINGH, V, K; JAGANNADHAM,M. V. Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Iponomea carnea* (morning glory).**J. Agric. Food Chem.**, v.55,p. 5809-5818,2007.

PERANDIN, D.; MAIOLI, M.A.; SANTOS, P.R.S.; PEREIRA, F.T.V.; MINGATTO, F.E.. Proteção do dano oxidativo hepático induzido por ferro pelo extrato aquoso da planta *Plectranthus barbatus*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.9-17, 2015

PEREIRA, D. A. **Proteases e inibidores de proteases em látex vegetal e intestino de lagartas: aspectos sobre resistência e suscetibilidade das plantas alvo**. 2014. 115f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**, p. 877-888. 2008.

PINHEIRO, R. S. P. **Efeito Gastroprotetor de uma Fração Isolada do Látex de *Plumeria rubra* (APOCYNACEAE) em Lesão Gástrica Induzida por Etanol: Envolvimento de Receptores TRP1, da Via NO/GMPc/KATP e da Glutathiona**. 2012. 107f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PIRES, H. B. J; BORGES, L. M.. F.; SOUSA, L .A. D.; CUNHA, L .C. ; JUNIOR, R. S. L.; MELO, D. F. A.; PEREIRA, M. E. Avaliação da Toxicidade aguda do Extrato Hexânico de Frutos de *Melia azedarach* (Miliaceae) em camundongos. **Revista Ciência Animal Brasileira**. v. 13, n. 4, 2012.

RABELO, A. F. L. **Caracterização *in vivo e in vitro* da resposta inflamatória aguda induzida por uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (Ait) R. Br**. 2014.115f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RADHA, R.; SRIRAM, L.; NARAYANAN, N. Antibacterial and antifungal activities of methanolic extract and the isolated fraction of *Plumeria alba* Linn. **Natural Product An Indian Journal**, v. 4. 2008.

RAMOS, E. H. S. **Avaliação das atividades biológicas do óleo do látex da *Mangifera indica* L. (var. Espada e Rosa)**. 2014. 93 f. Tese (Doutorado em Inovação Tecnológica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RAMOS, M.V., AGUIAR, V.C., da SILVA XAVIER A.A., LIMA, M.W., BANDEIRA, G.P., ETCHELLS, J.P., NOGUEIRA, N.A., ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**. v. 77 (4), pp. 251-256, 2006.

RAMOS, M. V; SOUZA, D. P.; GOMES, M. T. R.; FREITAS, C. D. T.; CARVALHO, P. A. V. R. J.; SALAS C. E. A Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*. **Protein J** (2014) 33: 199.

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

RAMOS M.V.; SILVA, C.A.; FREITAS, C.D.T...; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N.M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v.385 (5), pp. 455-463, 2012.

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

RASMANN, S.; JOHNSON, M. D.; AGRAWAL, A. A. Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. **Journal of Chemical Ecology.** v. 35, p. 1326–1334, 2009.

ROBBINS & COTRAN; 2005; **Bases Patológicas das Doenças**, Patologia., 7ª. Ed. Editora Elsevier.

RODRIGUES, P. S. M. **Avaliação Das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante E Antineoplásica Dos Extratos Etanólicos Da Casca E Folhas Da Terminalia fagifolia Mart. et Zucc (COMBRETACEAE).** 2016. 106f. Dissertação (Mestrado Ciências do Ambiente). Universidade Federal do Tocantins, Palmas.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia.** – Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria: Rede e-Tec Brasil, 2013.

SAADI, S.; WRENSHALL, L. E.; PLATT, J. L. Regional manifestations and control of the immune system. **FASEB J.**, v. 16, p. 849-856, 2002.

SANTANA, L. A. B. **Avaliação Da Atividade Antidiarreica de Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760).** 55f. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), da Universidade Federal do Piauí, Parnaíba.

SANTANA, L. A. B.; ARAGÃO, D. P.; ARAÚJO, T. S. L.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; OLIVEIRA, L. E. S.; PEREIRA, A. C. T. C.; FERREIRA, G. P.; OLIVEIRA, N. V. M.; SOUZA, B. S.; SOUSA, F. B. M.; RAMOS, M.; FREITAS, C. D. T.; MEDEIROS, J. V. R.; OLIVEIRA, J. S. Antidiarrheal effects of water-soluble proteins from *Plumeria pudica* latex in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. p. 97–1154, 2018.

SARATHA, V.; SUBRAMANIAN, S. P. Lupeol, a triterpenoid isolated from *Calotropis gigantea* latex ameliorates the primary and secondary complications of FCA

induced adjuvant disease in experimental rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 27–37, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 24;25(1), p. 192-2005, 1968.

SETHI, A.; MCAUSLANE, H. J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUESSELY, G.S; NAGATA, R.T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex mediated insect resistance in romaine lettuce. **J. Chem Ecol.**, v. 35, p. 190-200, 2009.

SHAHJAHAN, M.; SABITHA, K. E.; MALLIKA, J.; SHYAMALA-DEVIS, C. S. Effect of Solanum trilobatum against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. **Indian J. Med. Res.**, v.120, p.194-198, 2004.

SHARON, A.; CENTER, D. M. V. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**, p.1166-1183, 1995.

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.

SILVA, G. C. **Morinda citrifolia L. Investigação Científica Das Propriedades Biológicas Com Base No Uso Popular**. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, M. C. C.; SILVA, A. B.; TEIXEIRA, F. B.; SOUSA, P. C. P.; RONDON, R. M. M.; HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R.; SAMPAIO, L. R. L.; OLIVEIRA, S. R.; HOLANDA, A. N. M.; VASCONCELOS, S. M. M. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 332–336, 2010.

SILVA, A. M. A. P.; SILVA, A. M; MASSON, R.; MOTA, R. D.; COSTA, N. C.; RIBEIRO, E. E.; LOUREIRO, W. A. S.; FIGUEIREDO, P. M. S. Avaliação da atividade antimicrobiana da planta *Tradescantia pallida* Munt (Taboquinha Roxa). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.3, p.374-378, 2015.

SILVA, G. A. **Avaliação de Atividades Farmacológicas e Toxicidade de Plantas Medicinais do Semiárido do Nordeste Brasileiro**. 2016. 186f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

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

SOUSA, A. A. S. **Galactana Sulfatada da Alga Marinha Vermelha *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux: Respostas Na Inflamação e Nocicepção.** 2010. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

SOUZA, A. R. C. *et al.* Identificação das espécies ornamentais nocivas na arborização urbana de Santiago/RS. **REVSBAU**, Piracicaba – SP, v.6, n.2, p.44-56, 2011.

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

SPÓSITO, L. **Caracterização biológica e prospecção terapêutica de *Casearia sylvestris* Swartz não incorporada e incorporada em sistema nanoestruturado com enfoque na atividade anti-*Helicobacter pylori*.** 96f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** Caps 21, 22,23 e 26. São Paulo:Roca, 2007.

TREVISAN, L. F.A. **Estudo toxicológico e investigação da atividade antiliteásica do extrato de *Dianthus caryophyllus*.**2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal De Campina Grande, Patos.

THIMOTEO, S. S. **Isolamento e caracterização molecular de três quitinases de uma biblioteca metagenômica.** 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TOMAR, R; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M.V. A stable serine protease, wrightin from the látex of the plant *Wrightia tictoria* (Roxb.) R, Br: purification and biochemical properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 1479-1847,2008.

TURMINA, J. A. **Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI.** 2012. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Guarapuava.

THIMOTEO, S. S. **Isolamento e caracterização molecular de três quitinases de uma biblioteca metagenômica.** 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

UCHIYAMA, M. AND MIHARA, M. (1978) Determination of malonedialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, 86, 271-278.

VASCONCELOS, T. H.; FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o

extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** 17(4): Out./Dez. 2007.

VIANA, C. A. **Caracterização bioquímica da atividade pró-coagulante de proteases de fluidos laticíferos.** 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

VIANA, C. A. **Caracterização bioquímica e atividades biológicas de quitinases laticíferas De Calotropis Procera.** 2015. 182f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

VILHENA, T. C. **Avaliação da Toxicidade e dos Efeitos do Extrato Etanólico Seco das Cascas de *Himatanthus Articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae) Sobre as Alterações Oxidativas na Malária Experimental *In Vivo*.**2012.138f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, Belém.

WELBORN C. R, GOLDMAN G, PETERSON J. S, VALERI C. R, SHEPRO D, HECHTMAN H. B. Pathophysiology of ischemia-reperfusion on injury: central role of the neutroph. *Br J Surg* 1991; 78:651-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **WHO traditional medicine strategy 2002–2005.** Geneva: WHO; 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **WHO traditional medicine strategy 2014–2023.** Geneva: WHO; 2013.

XAVIER, A.L. **Avaliação da Toxicidade e Atividade Antitumoral de Nanopartículas de Óxido de Cério Associadas ao Óleo de Zinco.** 2015. 152f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

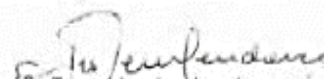


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Bioprospecção de plantas do Estado do Piauí com vistas à identificação e caracterização de proteínas com potencial biotecnológico", protocolo nº 037/15, sob a responsabilidade de JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da 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 27/08/2015.

Vigência do Projeto	Outubro/ 2015 à Julho/ 2017
Espécie/ linhagem	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	192
Peso/ Idade	20-25 g/ 45 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Centro de Ciências Agrárias- CCA da Universidade Federal do Piauí.

Teresina, 27 de Agosto de 2015.


 Prof.ª Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)
 Coordenadora

ANEXO II – PARÂMETROS DE SCREENING HIPOCRÁTICO UTILIZADOS NOS ENSAIOS TOXICOLÓGICOS (BRITO, 1994).

Função	Parâmetro	Sinais de Toxicidade	Escore
ATIVIDADE	Atividade Geral	Avaliação da atividade geral do animal na gaiola após estímulo. Entende-se como atividade geral, dentre outros comportamentos a presença de locomoção, levantar, farejar e/ou parado.	0 – não se move 1 - animal dá um passo 2 – animal dá meia volta na caixa de observação 3 – animal dá duas voltas na caixa (padrão) 4 - animal andando com agilidade
SISTEMA SENSORIAL	Frêmito Vocal	Emissão de som vindo da região torácico-abdominal sem nenhum estímulo ou toque.	0 – ausente 1 – presente
	Irritabilidade	Resposta do animal após toque e sopro na face.	0 – ausente 1 – presente
	Reflexo Auricular	Posição da orelha, após vários estalos consecutivos; quanto mais próxima da cabeça, menor é o reflexo.	0 – ausente, orelha colada à cabeça 1 – orelha ligeiramente colada na cabeça 2 – orelha em pé pela metade 3 - orelha em posição usual (padrão) 4 - orelha totalmente em pé
	Reflexo Corneal	Reflexo dos olhos após a aproximação lenta de uma pinça, mas sem nenhum toque.	0 – olhos ficam abertos 1 – quase não se movem 2 – movem-se pouco e lentamente 3 - fecham pela metade quando a pinça se aproxima 4 - fecham totalmente quando a pinça se aproxima (padrão)

	Aperto de cauda	Resposta ao aperto intenso da extremidade da cauda com uma pinça.	<p>0 – não se move</p> <p>1 – move-se lentamente</p> <p>2 – move-se rápido</p> <p>3 - move-se e pula (padrão)</p> <p>4- move-se, pula e corre</p>
	Resposta ao toque	Resposta ao toque prolongado (mais de 15 segundos) com uma pinça.	<p>0 – não se move</p> <p>1 – pouco movimento</p> <p>2 – dá um passo</p> <p>3- anda com dificuldade</p> <p>4- anda com agilidade (padrão)</p>
SISTEMA PSICOMOTOR	Contorção	Movimento Vermiforme do corpo	<p>0 – ausente (padrão)</p> <p>1- presente</p>
	Trem Posterior	Verificar se a postura das patas traseiras (trem posterior) está caída ou arrastando	<p>0 – ausente (padrão)</p> <p>1- queda do trem posterior pouco visível</p> <p>2 - queda do trem posterior visível; animal anda com lentidão</p> <p>3 - queda do trem posterior visível; animal anda com dificuldade</p> <p>4 - queda do trem posterior visível; animal anda com dificuldade e arrasta o trem posterior</p>
	Reflexo de Endireitamento	Reposta do animal para voltar à posição normal quando é colocado com o dorso sobre uma superfície (máximo 15s)	<p>0 – não se move</p> <p>1 - volta lentamente e com dificuldade</p> <p>2 - volta lentamente</p> <p>3 – volta rápido</p> <p>4 - volta imediatamente e com agilidade (padrão)</p>

	Tônus Corporal	Verificar se o corpo está normal (presente) ou não	0 – ausente 1 – presente (padrão)
	Força para Agarrar	Intensidade com quem o animal se agarra a uma grade quando esta tem sua posição levemente modificada	0 – não se agarra 1 – se agarra, mas em seguida larga a grade 2 – segura por um tempo, mas cai 3 - segura firmemente, mas não suporta e cai 4 - segura firmemente e não cai (padrão)
	Ataxia	Movimentos desordenados devido a oscilações entre estados de consciência e inconsciência	0 - ausente (padrão) 1 – presente
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	Tremores	Observar a presença ou não.	0 – ausente (padrão) 1 – presente
	Convulsões	Observar a presença ou não.	0 – ausente (padrão) 1 – presente
	<i>Straub tail</i> (cauda ereta)	Verificar se a cauda está ereta ou normal.	0 – ausente (padrão) 1 – presente
	Hipnose	Animal quieto e sem movimento, mas se tocado abre os olhos e responde ao estímulo.	0 – ausente (padrão) 1 – presente
	Anestesia	Ausência de resposta ao estímulo doloroso com perda de reflexo de endireitamento	0 – ausente (padrão) 1 – presente
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO	Ptose	Pálpebras fechadas ou semifechadas mesmo após estímulo.	0 – ausente (padrão) 1 – ligeiramente fechado 2 - semifechado 3 - quase totalmente fechado 4 – fechado

	Lacrimação	Presença ou ausência.	0 – ausente (padrão) 1 – presente
	Micção	Número de micções.	Número de poços de urina.
	Defecação	Número de bolos fecais.	Número de pellets de excreta.
	Piloereção	Ereção dos pelos corpóreos.	0 – ausente (padrão) 1 – ereção leve 2 - grau ligeiramente maior que o anterior 3 - visível, mas não totalmente ereto 4 - totalmente ereto
	Hipotermia	Temperatura do corpo do animal abaixo do normal (avaliar sobretudo as extremidades).	0– ausente (padrão) 1– ligeiramente frio 2 - frio 3 - gelado 4 - gelado e com cianose
	Respiração	Normal, hiper ou hipoventilação.	0 – normal (padrão) 1– ligeiramente acelerado 2 - mais acelerado 3 - muito acelerado 4 – ofegante

