

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Graduação do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)

ALEX BRALL RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA, CICATRIZANTE E  
ANTI-INFLAMATÓRIA DO MESOCARPO DE BABAÇU (*Attalea  
speciosa*, Mart.)**

São Luís

2019

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Graduação do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)

ALEX BRALL RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA, CICATRIZANTE E  
ANTI-INFLAMATÓRIA DO MESOCARPO DE BABAÇU (*Attalea  
speciosa*, Mart.)**

Monografia apresentada como requisito para  
a obtenção do título Bacharelado em Ciências  
Biológicas pela Universidade Federal do  
Maranhão.

Orientadora: Dra. Rosane Nassar Meireles  
Guerra

Coorientadora: Dra. Mayara Cristina Pinto da  
Silva

São Luís

2019

Rodrigues Silva, Alex Brall.

Avaliação da atividade analgésica, cicatrizante e anti-inflamatória do mesocarpo de babçau (*Attalea speciosa*, Mart) / Alex Brall Rodrigues Silva, Rosane Nassar Meireles Guerra. - 2019.

20 f.

Coorientador(a): Mayara Cristina Pinto da Silva.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. *Attalea speciosa*. 2. Babaçu. 3. Cicatrização. 4. Imunomodulação. 5. Analgesia. 6. Inflamação I. Nassar Meireles Guerra, Rosane. II. Nassar Meireles Guerra, Rosane. III. Pinto da Silva, Mayara Cristina. IV.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E CICATRIZANTE  
DO MESOCARPO DE BABAÇU (*Attalea speciosa*, Mart.)**

Artigo apresentado como requisito para a  
obtenção do título Bacharelado em Ciências  
Biológicas pela Universidade Federal do  
Maranhão.

Orientadora: Dra. Rosane Nassar Meireles  
Guerra

Coorientadora: Dra. Mayara Cristina Pinto da  
Silva

São Luís, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

Departamento de Patologia

---

Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Júnior

Departamento de Biologia

---

Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira

Departamento de Biologia

A Deus, por permitir que tantas coisas maravilhosas acontecessem na minha vida A minha mãe, que esteve ao meu lado em todos os momentos, sem exceção. Amo-te!

## AGRADECIMENTOS

O primeiro e maior agradecimento é a Deus, por ouvir minhas orações e me fazer forte para passar por tudo que fosse preciso. Não há palavras para agradecer tudo que fizestes por mim, pois tuas bênçãos são infinitas e maravilhosas.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra por todo direcionamento, carinho e atenção nessa trajetória, suas palavras e seus gestos foram e estão sendo importantíssimos!

Agradeço muito minha família, por toda a ajuda e ensinamentos que me deram, não só agora, mas também por toda a minha vida. Aqui uma dedicação especial á minha mãe, que nunca contou esforços para que eu pudesse chegar até aqui, não poupou recursos nem muitos menos tempo para que essa vitória fosse conquistada. Mãe, se eu tivesse que retribuir tudo que fizestes por mim, uma vida não seria suficiente! Muito obrigado.

Sou muito grato a Lule dos Santos Araújo, minha namorada, que entrou na minha vida nos últimos meses desse trabalho, e sem saber, conseguiu me instigar a buscar o meu melhor não só na vida pessoal, mas também acadêmica. Sem dúvidas foi a pessoa que mais esteve próxima, e sempre doou seu ombro nas mais diversas circunstâncias.

Aos meus amigos pelo apoio e cumplicidade. Gostaria de agradecer aos meus amigos de coração Vinicius e Mateus, na qual partilhamos muitos momentos de diversão, aprendizagem e crescimento.

Gostaria de agradecer aos meus amigos de ciência Vitor Augusto e Danielle Cristine por toda a colaboração e ajuda. Juntos, conseguimos vencer barreiras que jamais achei que eu fosse capaz. Vocês que acompanharam de perto momento a momento e que sempre deram forças quando o vento não soprava tanto ao nosso favor.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCG	Bacilo <i>Calmette-Guérin</i>
CBA	Cytometric bead array
CEUA	Comitê de ética e uso animal
EAB	Extrato aquoso bruto
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF- $\gamma$	Interferon gama
PBS	Solução salina tamponada
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
PPD	Derivado proteico purificado
TGF-B	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alpha
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
TH1	T helper 1
TH2	T helper 2
TH17	T helper 17
RPM	Rotações por minuto
FL1	Canal de fluorescência 1

SSC	Dispersão lateral
FSC	Dispersão frontal
F4/80	Proteína transmembrana
CD86	Molécula coestimulatória
CXC	Citocina quimiotática de neutrófilos
G-CFS	Fator estimulador de colônias granulocitárias
Elisa	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática



## Sumário geral

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
2.1. Babaçu .....	12
2.2. Inflamação, cicatrização e dor .....	13
2.3. Vacina BCG.....	15
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. Geral.....	16
3.2. Específicos .....	16
<b>4. PRIMEIRO ARTIGO .....</b>	<b>17</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>20</b>
<b>Material e métodos .....</b>	<b>21</b>
Preparo do extrato.....	21
Animais e tratamento.....	21
Indução da inflamação crônica com bcg .....	22
Contagem total e diferencial de células .....	22
Produção de citocinas .....	23
Avaliação do <i>burst</i> oxidativo por dihidro-rodamina 123 (dhr) .....	23
Imunofenotipagem de linfócitos e macrófagos .....	24
Análise estatística .....	25
<b>Resultados .....</b>	<b>26</b>
Avaliação da evolução da lesão.....	26
O tratamento com eab inibiu a produção de citocinas.....	27
Contagem total e diferencial de células do sangue.....	28
Contagem total e diferencial do peritônio .....	29
Babaçu aumenta linfócitos e de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> TCD8 <sup>+</sup> no linfonodo popliteo .....	30
Produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	31
<b>Discussão .....</b>	<b>31</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>34</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>34</b>
<b>5. SEGUNDO ARTIGO .....</b>	<b>40</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>43</b>
<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>44</b>

Material vegetal .....	44
Animais.....	44
Indução de dor aguda – tail flick .....	44
Efeito do EAB na cicatrização de feridas cutâneas .....	45
Coleta do sangue.....	45
Obtenção do lavado peritoneal e baço, contagem total e diferencial das células .....	46
Análise estatística .....	46
<b>Resultados .....</b>	<b>47</b>
O EAB apresentou ação anti-nociceptiva central .....	47
Efeito imunoestimulador de EAB.....	48
Ausência de efeito do EAB na cicatrização.....	50
<b>Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>53</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL .....</b>	<b>56</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O babaçu, *Attalea speciosa* pertence a família Arecaceae, com grande distribuição em todo território nacional, com características dominantes e considerada pioneira, devida a sua grande capacidade de colonização em áreas degradadas (MAY, 1990; ANDERSON et al., 1991). O mesocarpo dos frutos é bastante utilizado na fitoterapia para tratamento de inflamações, feridas crônicas, úlceras, cólicas e ulcerações de pele, assaduras e vulvovaginites (SOUZA et al, 2011).

Algumas partes do fruto do babaçu são bastantes utilizadas na indústria e para fins terapêuticos, como é o caso do óleo e do mesocarpo obtido dos frutos da palmeira de babaçu. O óleo do babaçu é utilizado na indústria alimentícia e cosmética, com importante contribuição ao crescimento econômico no Maranhão, estado em que há maior extração deste recurso natural (PRANCE, 1985; IBGE, 2015;). O mesocarpo é utilizado na produção de pães, como alimento e como medicamento por diversas populações, que descrevem vários efeitos positivos nos mais diversos tratamentos (SOUZA et al, 2011).

Muitos desses efeitos foram cientificamente comprovados. Estudos utilizando o mesocarpo do babaçu, foram comprovaram vários efeitos, como a atividade imunomoduladora na ativação de linfócitos T (GUERRA et al, 2011), na produção de anticorpos (BARROQUEIRO et al 2001), na ativação de macrófagos (NASCIMENTO et al, 2006), e também atividade anti-inflamatória (SILVA et al, 2001; NASCIMENTO et al 2010) e antimicrobiana (BARROQUEIRO et al 2016), indicando que há uma potencial no tratamento de doenças causadas por micro organismos patogênicos.

A vacina constituída pelo *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) atenuado a partir do *Mycobacterium bovis*, confere proteção contra a tuberculose, doença causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Essa vacina, que foi testada pela primeira vez em 1921, é ainda hoje a mais utilizada em todo o mundo. A administração da vacina causa inflamação local, devido a respostas do sistema imune inato e também recruta principalmente linfócitos T CD4+, e o conjunto desses processos são responsáveis por dar início a inflamação local, decorrente da atividade contra o microorganismo

(CALMETTE, et al., 1927; ZWERLING, et al., 2011, CHEN et al., 2009; WINAU et al., 2006).

A inflamação é processo natural de organismos pluricelulares superiores, em que ocorre a liberação de mediadores e o recrutamento de células imunes, visando o reparo da área lesada. Segundo COUSSENS; WERB (2002), a inflamação aguda, primeira resposta do organismo ao patógeno, se caracteriza pelo recrutamento e ativação de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas entre outras, ativando uma série de mecanismos que visam neutralizar o patógeno.

O sistema imune é responsável por ativar e desativar vias intrínsecas em resposta ao processo inflamatório. As células da imunidade inata possuem funções fundamentais no início desse processo, e seus mediadores (citocinas e quimiocinas) são de grande importância para a comunicação, diferenciação, migração e ativação celular, tanto local, como sistemicamente (ARAI, 1990; LI; VERMA, 2002).

Na fase crônica, decorrente de lesões teciduais prolongadas, ocorre recrutamento e ativação de monócitos e linfócitos e também se tem início ao processo de angiogênese e fibrose. Durante todo esse período de reparação, as células atuam de forma conjunta, aumentando a capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T e também aumentando a liberação e/ou produção de mediadores e citocinas. Os macrófagos recrutados, participam de várias vias biológicas que são responsáveis por aumentar ou suprimir a resposta inflamatória.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Babaçu**

A espécie vegetal *Attalea speciosa* Mart ex Spreng possui vários nomes populares, entre eles “babaçu, guaguassu, aguassu, oauassu, uanassu, uauassu, bagassu, coco de macaco, entre outros (CORRÊA, 1984). Hoje sabe-se que o óleo dessa espécie representa a maior reserva nativa de óleo de todo o mundo e representa em vários estados, em especial no Maranhão, é um constituinte do PIB, contribuindo de forma significativa nesse indicador de crescimento (EMBRAPA, 1984; IBGE, 2015)

A *Attalea speciosa* serve como fonte de reserva extrativista, uma vez que todas as partes do fruto são utilizadas. Dentre eles, os que possuem maior valor comercial é o óleo extraídos a partir das amêndoas, que possui alto valor comercial e que é utilizado na

indústria de cosméticos alimentícia e recentemente na produção de biodiesel. São também extraídos a massa residual, que corresponde a 35%, que inclui o mesocarpo, produto utilizado (ROSENTHAL, 1975; LIMA, 2007<sup>1</sup>; LIMA et al., 2008<sup>2</sup>).

O babaçu, também antes denominada *Orbignya phalerata* Mart. é uma espécie da família Aracacea, que engloba todas as palmeiras de pequeno, médio e grande porte. São arbustos consideradas penenes, com caule não ramificado do tipo estirpe, que atinge alturas próximas aos 30 metros. A distribuição do babaçu ocorre em todas as regiões do Brasil, mas possui maior densidade no Norte e Nordeste do país, regiões que possuem clima tropical e temperado, essencial para o desenvolvimento da espécie (CAVALLARI, TOLEDO 2016; FERREIRA, 2010).

Nos últimos anos, um enorme número de estudos vem sendo realizados, e comprovando várias atividades do babaçu, em especial do mesocarpo. Já foram relatadas atividade cicatrizante na linha alba (BRITO, FILHO 2006), no cólon por via de administração oral (BALDEZ, 2006), no cólon com administração por via intraperitoneal (SILVA, 2015), também na cicatrização do estômago por via intraperitoneal (BATISTA, 2006), em feridas cutâneas com uso intraperitoneal (MARTINS 2006; MACIEL, 2007).

O babaçu já demonstrou atividade antinociceptiva (PINHEIRO, BOYLAN, FERNANDES, 2012), atividade antioxidante (SILVA et al., 2005), ativação de macrófagos (NASCIMENTO et al., 2006; SILVA 2018), atividade antimicrobiana e imunomoduladora (BARROQUEIRO et al., 2016), produção de anticorpos autorreativos (BARROQUEIRO et al., 2001), atividade antitumoral (FORTES et al., 2009), efeito antitrombótico (AZEVEDO, 2007), modulação no padrão de respostas de linfócitos th1 em camundongos propensos a th2 (GUERRA et al., 2011), e ação anti-inflamatória (NASCIMENTO et al. 2006; SILVA, PARENTE, 2001; MAIA, 1989),

## **2.2. Inflamação, cicatrização e dor**

O processo inflamatório se inicia quando há uma lesão tecidual causada por diversos agentes físicos, químicos ou biológicos. De forma simples, após o dano há liberação de mediadores inflamatórios e também de outras moléculas, que serão responsáveis por ativar vias de sinalização envolvidas não só pela remoção do agente agressor, mas também do reparo tecidual e pela retomada da homeostasia do organismo (RANIN, 2004; BANNENBERG, SERHAN; 2010).

A primeira fase desse processo é descrita como inflamação aguda. Ela é caracterizada principalmente por alterações vasculares, especialmente o aumento da permeabilidade vascular, o que permite que neutrófilos atraídos por citocina do tipo IL-8, possam migrar para os tecidos, para assim remover o estímulo agressor e também restos de tecidos extravasados localmente (BRADLEY, 1982; DVORAK, 1995; WEDMORE, WILLIAMS, 1981).

O processo inflamatório é responsável pelo do fluxo sanguíneo, causado pelo aumento da dilatação dos vasos e também pelo aumento da permeabilidade dos capilares provocando liberação de fluídos locais. Em paralelo a isso, ocorre a quimiotaxia com a migração de leucócitos para a zona lesada, e uma resposta sistêmica decorrente da alta atividade dos leucócitos no local. Esse conjunto de fatores possuem alguns sinais clínicos, como calor, rubor, edema e dor (ZHANG, 2007; RAINSFORD, 2006)

Caso o estímulo prejudicial não cesse ou se houver infecção viral, infecções crônicas e doenças autoimunes, o organismo pode ser acometido por inflamação crônica. Nessa inflamação os neutrófilos são substituídos por células mononucleadas (linfócitos e macrófagos). Nesse momento, o ambiente inflamatório se torna mais rico em citocinas e mediadores inflamatórios, estes serão responsáveis por promover a inflamação existente, e algumas citocinas como IL-6, TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$  são responsáveis por potencializar essa resposta (ISHIHARA, HIRANO, 2002; TETTA, 1990; SCHRODER, 2004).

A dor se inicia no momento em que há dano tecidual, causado pelos mais diversos agentes. Nesse momento são ativados nociceptores nos mais diversos tecidos, e eles, através de sinais eletroquímicos, são responsáveis por levarem esse estímulo ao sistema nervoso central (SNC), que é responsável por gerar a percepção de dor. Até que cessem os estímulos prejudiciais, há uma intensa liberação de sinais eletroquímicos, tornando prejudicial o estímulo criado no microambiente lesado (FIELDS, 1999; MAYER, PRICE, 1976; HAVRANKOVA, 1978).

Os mediadores inflamatórios uma vez liberados no momento do dano tecidual, promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de limiar elevado, e conseqüentemente a redução no limiar de percepção ao estímulo doloroso, exacerbada resposta a estímulos nociceptivos, descrito como hiperalgesia e dor espontânea, conhecida como alodínia (MEYER, 1994; BONICA, 1990).

A dor nociceptiva ou inflamatória resulta em hipersensibilidade, e causa diversas alterações no sistema nervoso periférico, como a diminuição do limiar de ativação dos nociceptores, o que desencadeia em uma percepção de dor exagerada. Dessa forma, os estímulos eletroquímicos se propagam mais facilmente, aumentando o potencial de membrana das células, que culmina na recepção por parte do sistema nervoso central de um estímulo exacerbado, levando o indivíduo a experimentar a dor patológica (LAMONT & TRANQUILLI, 2000; PLONER, 2006)

A inflamação é o início de ativação de vários processos, devido a grande liberação de mediadores inflamatório, fatores de crescimento e diferenciação além da ativação de várias células do sistema imune. O processo cicatricial possui 3 fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação tecidual. A cascata de resposta se inicia durante o processo inflamatório, é caracterizado pela alta atividade de neutrófilos, liberação de peróxido de hidrogênio, com aumento da atividade microbicida, que impede que a área seja colonizada por bactérias e fungos (LINGEN, 2001; SCHULTZ et al., 1991; KIM et al., 2008).

Em seguida, a fase proliferativa é caracterizada pelo alto recrutamento de macrófagos, os quais são responsáveis por secretarem citocinas e fatores de crescimento, mediadores que agirão sobre os fibroblastos, estimulando a deposição de colágeno e elastina, importantes componentes da matriz extra-celular. Os fibroblastos secretam TGF- $\beta$ , que age de forma autócrina, para que se tenha secreção constante dessas proteínas (GRINNELL, 2003; RICHES, 1988)

Esse processo intercala-se com o processo de remodelação tecidual, onde os fibroblastos também exercem um papel importante no estímulo dos queratinócitos através da secreção da citocina IL-6, para que haja a deposição a queratina, e assim a remodelação tecidual seja finalizada. As proteínas depositadas localmente são importantes para que haja remodelação tecidual adequada (KOH, 2011; ANDERSON, 2013; ALEXOPOULOU et al., 2007).

### **2.3. Vacina BCG**

As vacinas compõem um importante mecanismo para melhorar a defesa em humanos contra várias doenças, o que reduz gastos com saúde e previne vários surtos. As doenças que possuem vacinas desenvolvidas e que são controladas em países desenvolvidos e subdesenvolvidos representam um risco iminente para a saúde pública, uma vez que uma

variação para baixo na percentagem de imunização pode representar milhares de doentes. (ZAIAC et al, 1998; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; ADANS et al., 1993; ZWERLING et al., 2011).

A vacina do BCG (bacilo Calmette Guérin) é produzida a partir da cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* e protege contra a tuberculose, doença causada pela cepa selvagem de *Mycobacterium tuberculosis*. Muitas campanhas a nível mundial tem sido feitas com o intuito de aumentar a taxa de vacinação. O sucesso na vacinação do BCG depende não só de altas taxas de imunização, mas também da cepa que é utilizada, uma vez que, diferenças genéticas podem alterar a taxa de eficácia da vacina (CALMETTE, et al., 1927; PEREIRA, 2007).

A imunização contra a tuberculose realizada pela vacinação. Neutrófilos e macrófagos são capazes de reconhecer inicialmente o micro-organismo atenuado e realizarem o processamento e apresentarem o antígeno a população de linfócitos T CD4+ e também T CD8+. De forma simples, após essa fase, linfócitos T CD4+ e CD8+ são responsáveis por detectar o microorganismo patogênico (*Mycobacterium tubeculosis*) e dar início a uma resposta efetora eficiente, sem uma prévia apresentação por fagócitos, o que desencadeia o processo inflamatório (CHEN et al., 2009; WINAU et al., 2006).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.Geral**

- Avaliar o efeito do babaçu sobre a atividade anti-inflamatória, cicatrizante e analgésica

#### **3.2.Específicos**

- Avaliar o efeito do EAB sobre resposta inflamatória crônica, induzida pelo BCG
- Avaliação das populações celulares do linfonodo poplíteo e do peritônio na inflamação crônica induzida pelo BCG
- Quantificação de mediadores inflamatórios como citocinas e peróxido de hidrogênio no modelo de inflamação crônica induzido pelo BCG
- Investigar o efeito anti-nociceptivo do EAB na dor aguda
- Avaliar o papel do EAB na cicatrização de feridas cutâneas



#### **4. PRIMEIRO ARTIGO**

## **EFEITO IMUNOMODULADOR DO MESOCARPO DE BABAÇU REDUZ A INFLAMAÇÃO EM RESPOSTA AO BCG**

Alex Brall Rodrigues Silva;

Rosane Nassar Meireles Guerra

SÃO LUIS

2019

## RESUMO

O *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) confere proteção contra a tuberculose. A administração da vacina causa inflamação local, devido a respostas do sistema imune inato e também recruta linfócitos T CD4+. O babaçu (*Attalea speciosa*, Mart.) tem atividade anti-inflamatória e efeito imunomodulador na polarização de macrófagos e de linfócitos T. Avaliamos a ação do extrato aquoso do mesocarpo do babaçu (EAB) sobre a inflamação induzida pelo BCG e após desafio com PPD (Derivado proteico purificado). Foram utilizados camundongos Swiss, inoculados  $10^4$  bacilos, na pata posterior esquerda. Depois de 21 dias, os animais foram desafiados com PPD, e eutanasiados ao 34º dia. Foi avaliado o número de células de baço, sangue, peritônio e do linfonodo poplíteo. A produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi avaliada no peritônio. Avaliamos por citometria as populações de linfócitos T e macrófagos presentes no poplíteo e no peritônio. O tratamento com EAB reduziu a inflamação causada pelo BCG tanto na fase aguda, como na fase crônica, com especial ação após o desafio com PPD. O tratamento também reduziu a produção de IL-17, TNF- $\alpha$  e IL-6, aumentou o número de linfócitos CD4+ no peritônio e de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no linfonodo. O tratamento com EAB aumentou a produção de  $H_2O_2$  em cultura de células peritoneais estimuladas ou não com PMA. Concluímos que EAB tem ação anti-inflamatória na fase aguda e na fase crônica, possivelmente devido à redução de citocinas inflamatórias, aumento de  $H_2O_2$  e a ativação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, confirmando mais uma vez o efeito imunomodulador do extrato.

**Palavras-Chave:** *Attalea speciosa*, inflamação, BCG, imunomodulação, babaçu, PPD.

## ABSTRACT

The Bacillus *Calmette-Guérin* (BCG) protects against tuberculosis. The administration of this vaccine caused local inflammation, due to the activation of innate immune and acquired immune response and the recruit of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The babassu palm tree (*Attalea speciosa*, Mart.) has anti-inflammatory activity and an immunomodulatory effect, mainly to induce the polarization of macrophages and T lymphocytes. We evaluated the effect of the aqueous extract of babassu mesocarp (EAB) on the inflammation induced by BCG, after challenge with PPD (protein derivative purified). Swiss mice received 10<sup>4</sup> bacilli, in the hind left paw. After 21 days, the animals received PPD. At the 34<sup>o</sup> days it was evaluated the number spleen, blood, peritoneum and popliteal lymph node cells, the production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at the peritoneum and the cytokines levels in serum. T lymphocytes and macrophages at the lymph node and the peritoneum were evaluated by flow cytometry. The EAB treatment reduced the inflammation caused by the BCG either in the acute phase or in the chronic phase, mainly after the challenge with PPD. Treatment also reduced the production of IL-17 and IL-6, increased the number of CD4 + lymphocytes at the peritoneum, and the T helper and T cytotoxic in the lymph node. The EAB treatment increased the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a culture of peritoneal cells stimulated or not with PMA. We conclude that EAB has anti-inflammatory action in the acute phase and chronic phase, possibly due to a reduction on the inflammatory cytokines, an increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and, the activation of helper and cytotoxic T lymphocytes, showing an immunomodulatory effect in response to BCG.

Keywords: *Attalea speciosa*, inflammation, BCG, immune modulation, babassu, PPD.

## **Introdução**

O babaçu, *Attalea speciosa* pertence a família Arecaceae, com grande distribuição em todo território nacional, com características dominantes e considerada pioneira, devida a sua grande capacidade de colonização em áreas degradadas (MAY, 1990; ANDERSON et al., 1991). O mesocarpo dos frutos é bastante utilizado na fitoterapia para tratamento de inflamações, feridas crônicas, úlceras, cólicas e ulcerações de pele, assaduras e vulvovaginites (SOUZA et al, 2011).

Muitos desses efeitos foram cientificamente comprovados, como a atividade anti-inflamatória (SILVA; PARENTE, 2001; NASCIMENTO et al, 2006; 2010). Além disso, há evidências quanto ao efeito imunomodulador do mesocarpo de babaçu na polarização de macrófagos (SILVA et al, 2018) e de linfócitos T auxiliares (GUERRA et al, 2011), na atividade antimicrobiana (BARROQUEIRO et al., 2016) entre outros efeitos sobre a ativação sistema imune.

A vacina constituída pelo *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) atenuado, confere proteção contra a tuberculose. Essa vacina, que foi testada pela primeira vez em 1921, é ainda hoje, a mais utilizada em todo o mundo. A administração da vacina causa inflamação local, devido a respostas do sistema imune inato e também recruta principalmente linfócitos T CD4+, e o conjunto desses processos são responsáveis por dar início a inflação local, decorrente da atividade contra o microorganismo (CALMETTE, et al., 1927; ZWERLING, et al., 2011, CHEN et al., 2009; WINAU et al., 2006).

A inflamação é processo natural de organismos pluricelulares superiores, em que ocorre a liberação de mediadores e o recrutamento de células imunes, visando o reparo da área lesada. Segundo COUSSENS; WERB (2002), a inflamação aguda, primeira resposta do organismo ao patógeno, se caracteriza pelo recrutamento e ativação de macrófagos, neutrófilos, células dendrítica entre outras, ativando uma série de mecanismos que visam neutralizar o patógeno.

O sistema imune é responsável por ativar e desativar vias intrínsecas em resposta ao processo inflamatório. As células da imunidade inata possuem funções fundamentais no início até a finalização desse processo desse processo, e seus mediadores (citocinas e quimiocinas) são de grande importância para a comunicação, diferenciação,

migração e ativação celular, tanto local, como sistemicamente (ARAI, 1990; LI; VERMA, 2002).

Na fase crônica, decorrente de lesões teciduais prolongadas, ocorre recrutamento e ativação de monócitos e linfócitos e também se tem início ao processo de angiogênese e fibrose. Durante todo esse período de reparação, as células atuam de forma conjunta, aumentando a capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T e também aumentando a liberação e/ou produção de mediadores e citocinas. Os macrófagos recrutados, participam de várias vias biológicas que são responsáveis por aumentar ou suprimir a resposta inflamatória.

No decorrer do processo inflamatório há a ativação e desativação dessas células, que, muitas vezes, adquirem o perfil M1 e secretam citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL8, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), entre outras. Posteriormente, acontece a desativação dessas células efectoras, as quais passam a assumir o perfil M2, com o aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , mediadores capazes de controlar a proliferação e a diferenciação celular e, estão diretamente envolvidos na reparação dos tecidos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

## **Material e métodos**

### **Preparo do extrato**

A farinha comercial foi obtida da empresa Flora Maranhense, a qual realiza a extração do babaçu na cidade de Esperantinópolis (sul do Maranhão). A farinha do mesocarpo foi misturada a água deionizada, para obtenção do extrato bruto aquoso bruto (200mg/mL).

Para extração se utilizou água para injeção, a temperatura ambiente, sob agitação constante e leve. Logo em seguida, a suspensão foi filtrada com filtro 25  $\mu$ m, centrifugada e liofilizada. O material resultante foi diluído em de solução salina tamponada com fosfato 0,15M (PBS), com pH 7,2 para utilização nos ensaios (GUERRA et al, 2011).

### **Animais e tratamento**

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas, todos com peso entre 25 a 30g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e alocados na Biotério setorial. Foram utilizados 10 animais e delimitados 2 grupos experimentais: O grupo 1 com 5 animais foi designado

por grupo BCG e não sofreu nenhuma intervenção, e o grupo 2 também com 5 animais, recebeu 200mg/ml do EAB via oral uma vez ao dia durante todo o experimento.

Os animais foram mantidos sob luz durante 12h e sem luz durante 12h, a temperatura ambiente controlada de 25°C e ração esterilizada e água oferecidos *ad libitum*. Os protocolos utilizados foram previamente aprovados pelo CEUA-UFMA, processo nº 23115.009717/2015-10. O experimento foi executado uma única vez, por falta de disponibilidade de animais por parte do Biotério central.

### **Indução da inflamação crônica com bcg**

A vacina BCG (Bacilo *Calmette-Guérin*), 100mg/mL, com 10<sup>8</sup> bacilos/mL (Instituto Butantã, São Paulo, Brasil) foi inoculada no espaço subcutâneo do coxim plantar, da pata posterior esquerda, na quantidade de 10<sup>4</sup> bacilos (ROXO & SINHORINI, 1994). Ao final de 21 dias os animais foram desafiados com 10µL de PPD, conhecido como Derivado Proteico Purificado de *M. bovis* (GULD et al, 1958). As medidas do tamanho das patas foram realizadas a cada 24 horas até o 3º dia e depois de 4 em 4 dias até o final do experimento, com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo, Japão) de alta precisão.

### **Contagem total e diferencial de células**

Ao final dos 34 dias, os animais foram eutanasiados para a retirada do baço, sangue, lavado peritoneal e linfonodo drenante para quantificação da produção de citocinas e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e para as contagens totais e diferenciais de células.

O sangue foi obtido por punção cardíaca, com o auxílio de agulha e seringa. Em seguida, 10 µL foram transferidos para tubos contendo Solução de Türk (Newprov®) na proporção 1:20 para contagem dos leucócitos e a contagem total de células foram realizadas em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico de luz comum (GREENWALT & ALLEN, 1990).

Para a contagem diferencial do sangue, foi feito um esfregaço (BAIN, 2005). As lâminas foram secas, fixadas com metanol, coradas com Giemsa e a leitura foi feita com o auxílio de um microscópio óptico de luz comum, utilizando óleo de imersão e objetiva de 100x. Foram contados 100 leucócitos e calculada as percentagens das diferentes

populações presentes no sangue (MAESTRELLI et al., 1995). O soro foi centrifugado e armazenado em freezer, para avaliação da produção de mediadores e ensaios posteriores.

O lavado peritoneal foi obtido a partir da injeção de 5mL de PBS estéril gelado na cavidade peritoneal. Após uma suave massagem a suspensão celular foi retirada com a seringa e agulha, acondicionado em tubos Falcon, centrifugado e corado com Solução de Turk (1/20) para determinar o número total de células (RAY & DITTEL, 2010).

O baço foi retirado, triturado em um tamiz, com 3mL de PBS, a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 15mL, centrifugada e corada para determinar o número total de células esplênicas com Solução de Turk na concentração de 1/20 (LONGERBEAM et al., 1961).

Para contagem diferencial as células peritoneais e esplênicas foram ajustadas e 100µL da suspensão celular ( $1 \times 10^5$ ), foram centrifugas em CitoSpin, durante 5 minutos a 800rpm. As lâminas foram coradas com um kit panótipo rápido (InstantProv), contendo 2 corantes e 1 fixador. A contagem diferencial dos leucócitos, considerou o percentual das diferentes populações após a contagem de 100 células (MAESTRELLI et. al, 1995). As células então, foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum e óleo de imersão, com a objetiva de 100x.

### **Produção de citocinas**

A técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) foi utilizada para quantificação das citocinas no sangue foi utilizado kit de citocinas Th1, Th2 e TH17 para camundongos (Bencton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA), conforme instruções do fabricante.

A leitura das amostras foi realizada no Citômetro de fluxo FACScalibur (Bencton Dickinson, San Jose, CA, USA) com ajuda do software CellQuest Pro v5.1, BD Biosciences. Após a leitura, os dados foram analisados com auxílio do software Flow Jow® V10 (TreeStar). Os valores foram expressos em pg/mL para cada uma das citocinas, a partir das curvas padrão (MAECKER, 2004).

### **Avaliação do *burst* oxidativo por dihidro-rodamina 123 (dhr)**

Para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a suspensão de células peritoneais foi ajustada para  $1 \times 10^5$ /mL, distribuídas em microtubos e marcadas com DHR, isoladamente, ou com DHR+PMA (50nM - *Phorbol Miristate Acetate*), para

avaliar a produção espontânea ou estimulada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os tubos foram incubados a 37°C, por 10 minutos. Após o tempo de reação com o DHR a reação foi bloqueada pela refrigeração das amostras em banho de gelo, por 10 minutos (EMMENDÖRFFER et al., 1990).

As suspensões celulares foram lavadas 2x com PBS, a 1500 RPM, 10 minutos, a 4°C e em seguida ressuspensas em PBS gelado. A reação foi avaliada com auxílio de um citômetro de fluxo, utilizando-se o canal FL-1, considerando os parâmetros de granulosidade (SSC) e tamanho celular (FSC), após a definição da janela de aquisição das células. Para análise, foram adquiridos 3000 eventos os quais foram analisados com auxílio do programa FlowJo (Tree Star Inc.).

### **Imunofenotipagem de linfócitos e macrófagos**

Após contagem de células peritoneais e linfonodo poplíteo, 10<sup>5</sup> células/mL foram ressuspensas e transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em formato U, marcadas com os anticorpos específicos, e incubadas a 4°C durante 15 minutos.

Foram montados 3 painéis de marcação do peritônio, e 2 painéis para marcação no linfonodo, com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos. Conforme tabela 1.

TABELA 1: PAINEL DE MARCAÇÃO CELULAR PARA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

<b>FLUOCROMO/ Células marcadas</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PERCP</b>
Linfócitos T helper	CD3+	CD28	CD4+
Linfócitos T citotóxicos	CD3+	CD28	CD8+
Macrófagos	F4/80	IaIe	CD86

Primeiramente as células foram analisadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e morfologicamente caracterizadas. Posteriormente foram analisados os parâmetros de tamanho (FSC) e a expressão de CD3+. Assim, pode-se delimitar a janela onde se encontrava a população de linfócitos T e as duas subpopulações de linfócitos T. Além



disso, as células peritoneais foram analisadas quanto a expressão de F4/80 e de CD 86 e IaIe. Todas as amostras foram lidas com o auxílio citômetro (Guava® easyCyte HT Sampling Flow Cytometer) e a análise e processamento de dados foi realizada com auxílio do programa FlowJo Versão 10.0 (TreeStar).

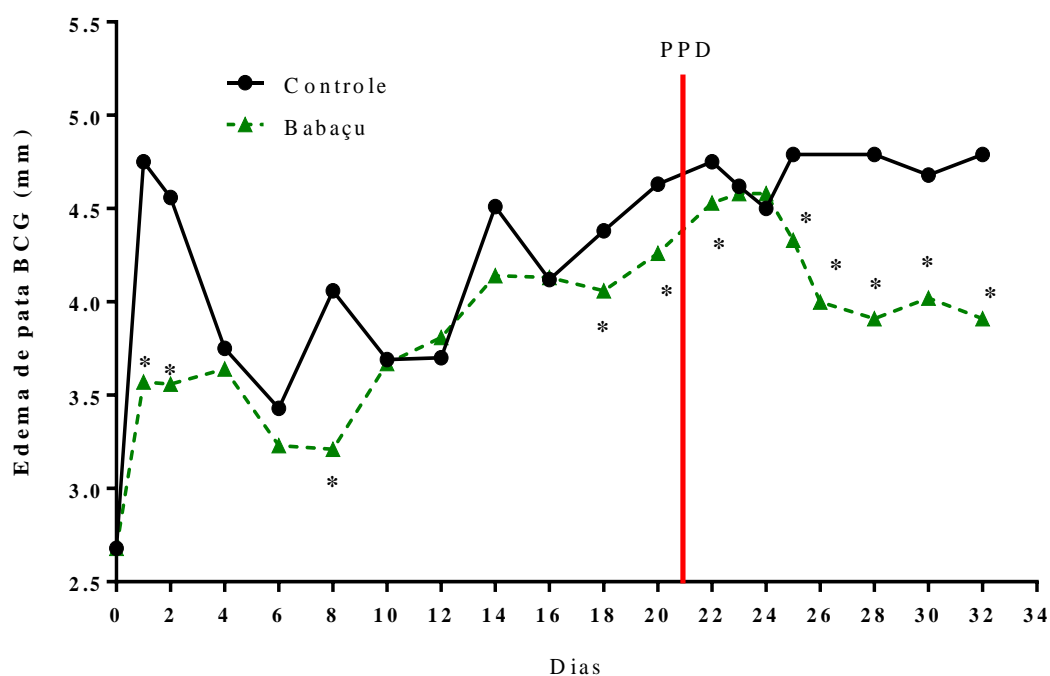
### **Análise estatística**

As análises foram realizadas com auxílio do Software Graph Pad Prism, versão 7.0. Foi usada a análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações e o teste t de Student para comparação entre dois grupos (VIEIRA, 2000). Em todas as análises foi considerado como nível de significância  $p \leq 0,05$ . Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, considerando o número de cinco animais por grupo (FISHER, 1925).

## Resultados

### Avaliação da evolução da lesão

Após a administração do BCG, o edema de pata sofreu um aumento no tamanho, entre 24 e 48 h, correspondente a mais de 71%, após inóculo do BCG, em comparação ao dia 0. No grupo babaçu nos mesmos intervalos, os valores foram menores e correspondeu a somente 25%. Novamente nos dias 8; 18 e 20, os valores do grupo tratado com EAB foram menores do que o controle. Após o desafio com PPD, no 21º dia, todos os valores obtidos no grupo babaçu foram menores do que controle, até que ao final do experimento. Enquanto no controle o aumento detectado era de 72%, no grupo babaçu foi apenas de 25%, semelhante ao observado na fase aguda, nos primeiros dias da avaliação.

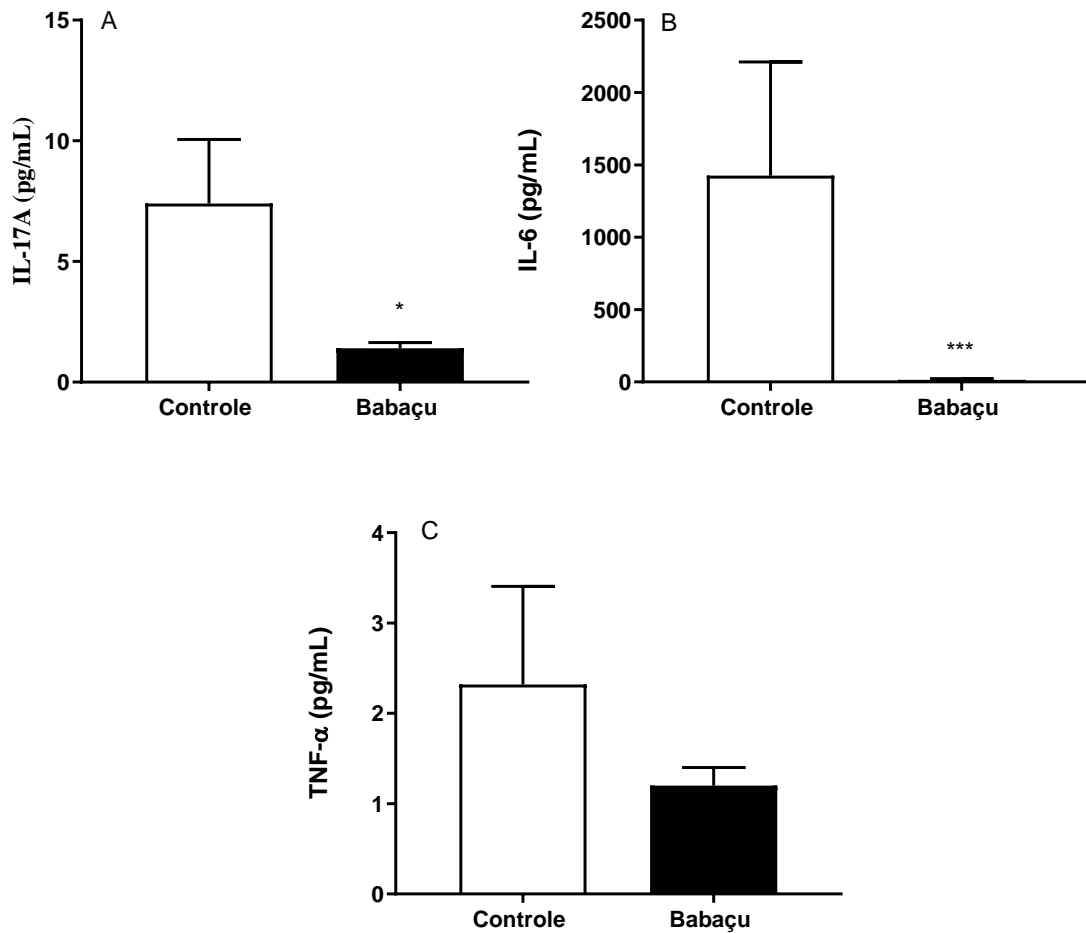


**Figura 1: Inibição da inflamação aguda e crônica causada pelo inóculo de BCG e desafio com PPD.**

Camundongos Swiss, fêmeas foram distribuídos em 2 grupos, cada um com 5 animais: - controle: recebeu água e Babaçu: foi tratado com EAB (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de  $10^4$  BCG. O desafio foi feito no 21º dia com PPD. Os resultados correspondem a média de 5 animais/grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao controle não tratado.

## O tratamento com eab inibiu a produção de citocinas

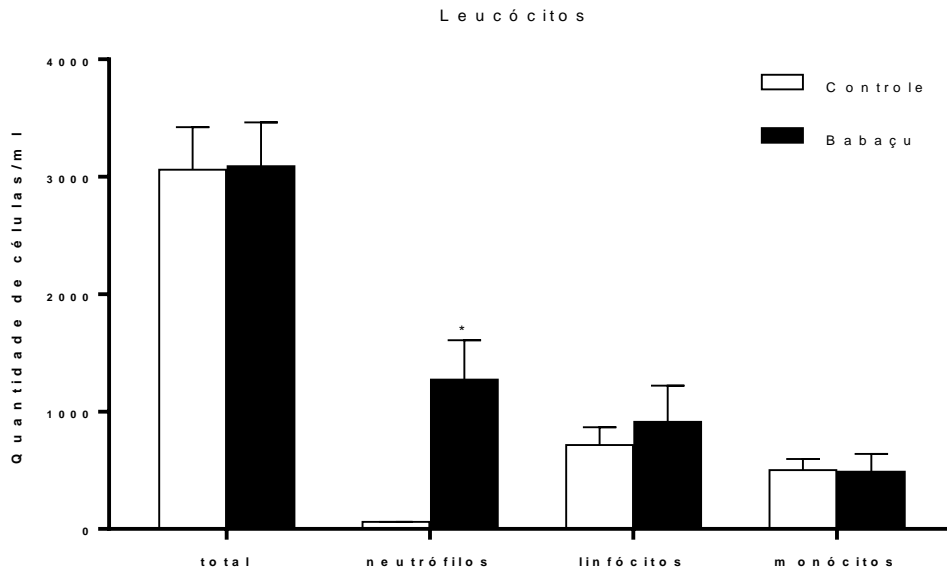
O tratamento com EAB reduziu a concentração circulante de IL-17 (Figura 2A) e IL-6 (Figura 2B), mas não afetou a concentração de TNF- $\alpha$  (Figura 2C).



**Figura 2: Produção de IL-17 (A), IL-6 (B) e TNF- $\alpha$  (C) no soro.** Camundongos Swiss, fêmeas foram distribuídos em 2 grupos, cada um com 5 animais: - controle: recebeu água e Babaçu: foi tratado com EAB (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de  $10^4$  BCG. O desafio foi feito no 21º dia com PPD. Os resultados correspondem a média de 5 animais/grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao controle não tratado

### Contagem total e diferencial de células do sangue

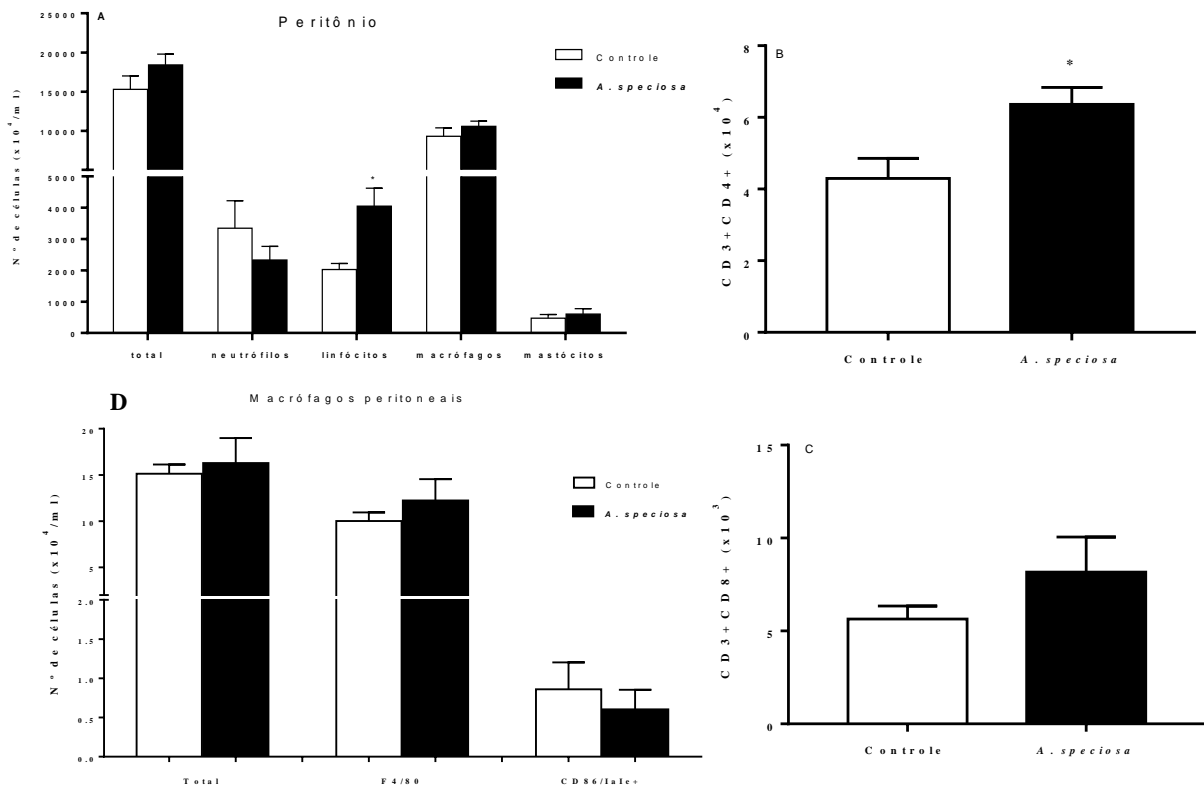
A contagem total mostrou que o EAB não interferiu nos leucócitos globais, linfócitos e monócito, porém, a contagem diferencial evidenciou que houve um aumento significativo nas populações de neutrófilos como mostra a Figura 3.



**Figura 3: Contagem total e diferencial de leucócitos.** Camundongos Swiss, fêmeas foram distribuídos em 2 grupos, cada um com 5 animais: - controle: recebeu água e Babaçu: foi tratado com EAB (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de  $10^4$  BCG. O desafio foi feito no 21º dia com PPD. Os resultados correspondem a média de 5 animais/grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao controle não tratado.

## Contagem total e diferencial do peritônio

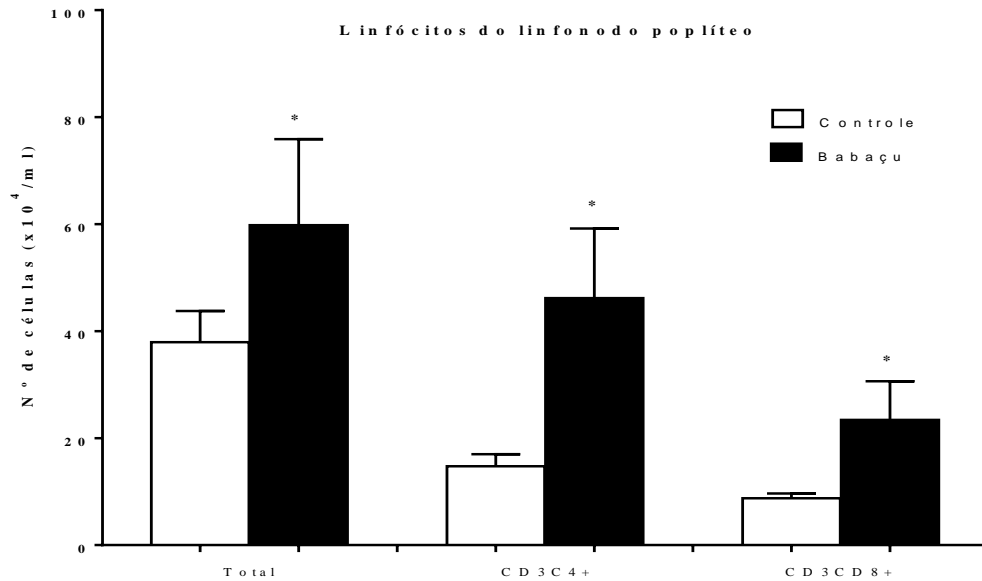
A contagem total de células no peritônio mostra que o tratamento com EAB aumentou o número de linfócitos (Figura 4A), especialmente linfócitos T auxiliares (Figura 4B) mas não afetou nem o número total, nem os números de neutrófilos, macrófagos e mastócitos (Figura 4A), nem o de linfócitos T citotóxicos (Figura 4C). O EAB também não teve efeito sobre a população de macrófagos, nem na expressão de marcadores de ativação (Figura 4D)



**Figura 4: Contagem total, diferencial de células (A) e número de linfócitos T auxiliares (B) e T citotóxicos (C) e macrófagos (D) no peritônio.** Camundongos Swiss, fêmeas foram distribuídos em 2 grupos, cada um com 5 animais: - controle: recebeu água e Babaçu: foi tratado com EAB (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de 10<sup>4</sup> BCG. O desafio foi feito no 21º dia com PPD. Os resultados correspondem a média de 5 animais/grupo. (\*) p < 0,05 em relação ao controle não tratado.

## Babaçu aumenta linfócitos e de linfócitos TCD4<sup>+</sup> TCD8<sup>+</sup> no linfonodo poplíteo

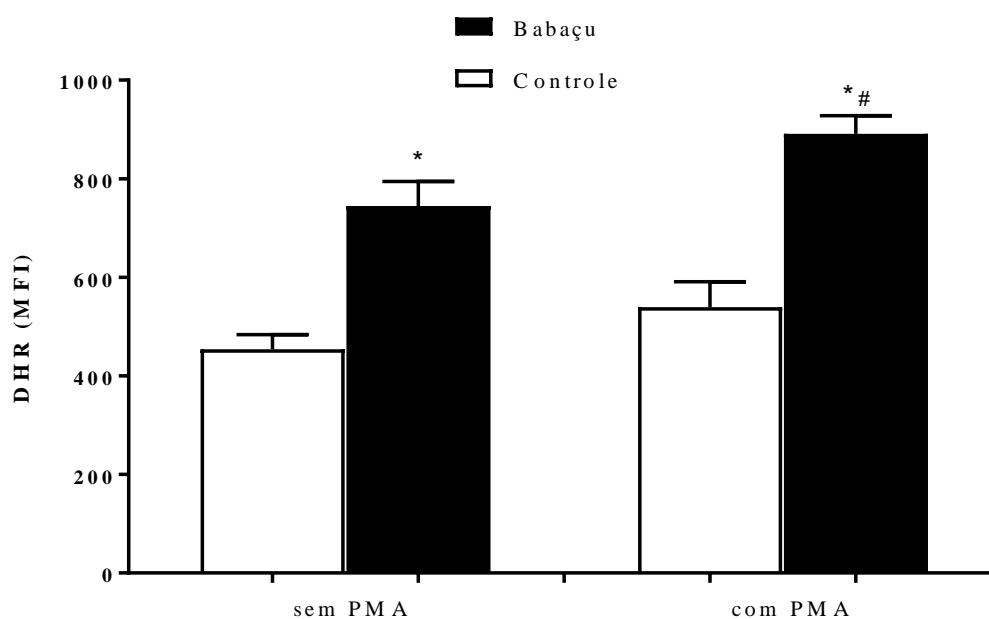
O tratamento com BCG aumentou o número total de linfócitos totais e de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no linfonodo poplíteo



**Figura 5: Número total de linfócitos e de T helper e T citotóxicos no linfonodo poplíteo.** Camundongos Swiss, fêmeas foram distribuídos em 2 grupos, cada um com 5 animais: - controle: recebeu água e Babaçu: foi tratado com EAB (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de  $10^4$  BCG. O desafio foi feito no 21º dia com PPD. Os resultados correspondem a média de 5 animais/grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao controle não tratado.

## Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O tratamento com EAB aumentou a produção de peróxido de hidrogênio e essa produção foi intensificada após o estímulo com PMA foi responsável por aumentar as quantidades de peróxido nos grupos controle e babaçu, mas, de forma mais acentuada grupo babaçu.



**Figura 6: Dosagem de peróxido em células do peritônio marcadas com DHR e estimuladas com PMA.**

Camundongos Swiss, fêmeas foram distribuídos em 2 grupos, cada um com 5 animais: - controle: recebeu água e Babaçu: foi tratado com EAB (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de 10<sup>4</sup> BCG. O desafio foi feito no 21º dia com PPD. Os resultados correspondem a média de 5 animais/grupo. (\*) p < 0,05 em relação ao controle não tratado.

## Discussão

Nesse trabalho avaliamos o efeito do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu na evolução da inflamação induzida por BCG e após o desafio com PPD. Observamos que o extrato apresentou ação anti-inflamatória na fase aguda, conseguindo impedir o avanço do edema. A ação do extrato também foi efetiva em reduzir a progressão da inflamação em outros intervalos, como no 8º dia e no intervalo entre o 18º e 20º antes do inóculo do PPD, sugerindo um efeito também na inflamação crônica, devido a essa resposta na fase mais tardia. Essa resposta na inflamação crônica, mostra que o extrato não só tem ação na inflamação aguda, como já foi demonstrado anteriormente com um modelo de

carragenina (Nascimento et al 2006; 2010), mas também na resposta mediada por linfócitos T, que geralmente ocorre na fase crônica da inflamação e da resposta ao BCG. As maiores inibições foram alcançadas após o desafio com PPD, sugerindo um efeito modulador sobre a memória imunológica, já que se trata de uma resposta secundária ao *Mycobacterium bovis* atenuado.

Numa outra perspectiva, é possível que a atividade encontrada esteja também relacionada as propriedades antibacterianas do extrato, já descrita por Barroqueiro et al (2016). Vale ressaltar que esse é o primeiro relato do efeito do babaçu na inflamação crônica induzida por BCG, possivelmente, efeito que também pode ser atribuído a linfócitos T auxiliares com perfil Th2, ou até mesmo a linfócitos T regulatórios, o que precisa ainda ser investigado. Corroboram com essa hipótese o efeito inibidor que o EAB apresentou quanto a concentração de IL-6 e IL-17, mesmo não tendo afetado as concentrações de TNF- $\alpha$ .

A IL-6 é uma citocina que está associada a respostas inflamatórias diversas, e o seu aumento na fase aguda influencia diretamente na fase crônica da inflamação (HEINRICH, CASTELL, ANDUS, 1990; TANAKA et al, 2014). A IL-6 tem ação no recrutamento e diferenciação de macrófagos, monócitos, estimula células NK a produzirem IL-17 e atua na diferenciação de células T CD4+ virgens, para o perfil Th17 (BAGGIOLINI; KUNKEL, 1989; PASSOS et al, 2010; ACOSTA-RODRIGUEZ, 2007). Assim, é razoável propor que a redução na produção de IL-6 repercutiu na redução de IL-17 e na ausência de ativação dos macrófagos observada em nosso estudo.

Os genes que são ativados pela ligação da IL-17 (KOLLS & LINDÉN, 2004) ao seu receptor na membrana, produzem proteínas que são responsáveis por estimular fatores ativadores de neutrófilos (G-CSF, quimiocinas (CXC)) e interleucina 6, uma potente indutora da resposta aguda. A IL-17 não é só produzida pelas células T, uma vez que sua expressão acontece antes mesmo da resposta dessas células.

A IL-17 é também produzida por linfócitos T  $\gamma\delta$ , macrófagos e células NK. Está frequentemente associada a resposta inata e a indução de respostas inflamatórias exacerbadas. (SUTTON et al., 2009). Assim, a redução de IL-17 pode ter também reduzido a inflamação, como observado em vários estágios e períodos do processo inflamatório induzido por BCG.



Durante a resposta ao BCG há um aumento na concentração de TNF- $\alpha$ , diferentemente dos nossos achados. De fato, o ensaio de dosagem de citocinas por CBA, parece não ter funcionado adequadamente, pois a maioria das citocinas apresentaram resultados não detectáveis, por isso estamos providenciando novos anticorpos para repetir a dosagem de citocinas por ELISA, o que poderia explicar a discrepância encontrada (YAMAMOTO et al, 2007)

A produção de peróxido de hidrogênio foi sempre aumentada nos animais tratados com babaçu. Corroborando com resultados anteriores que também descreveram o aumento de peróxido em camundongos imunizados com BCG (Silva et al. 2011). Concentrações maiores de peróxido de hidrogênio indicam tanto a ativação de macrófagos, como de neutrófilos e tem importante papel tanto no controle da inflamação como da infecção. Indicam também, segundo resultados de JACKETT et al. (1981), ativação da imunidade adquirida, como ocorreu no nosso estudo.

É comum que em camundongos inoculados com BCG haja um aumento de células no sangue, baço e peritônio, principalmente após desafio com PPD na terceira semana, seguido de uma queda acentuada após o final da resposta. Os nossos resultados mostram que o tratamento com EAB somente alterou o número de neutrófilos no sangue e de linfócitos no peritônio e linfonodo poplíteo, exercendo uma ação imunomoduladora sobre o processo inflamatório, sobretudo na resposta secundária, após o desafio com PPD. (TANAKA et al, 2007).

Sabe-se que os Neutrófilos são importantes células na inflamação aguda por BCG, no entanto os nossos resultados mostram uma persistência dessa população mesmo na fase crônica da resposta, reforçando o papel imunomodulador e/ou imunoestimulador do extrato sobre diferentes populações celulares (Abbadie et al. 2005)

Assim, o as respostas ao BCG/PPD parecem ter sofrido influência do tratamento com EAB, tornando esse extrato uma alternativa viável para o tratamento concomitante na inflamação, já que o tratamento com EAB aumenta a quantidade de neutrófilos e linfócitos T, indicando ação tanto na imunidade inata, quanto adaptativa (BAGGIOLINI; KUNKEL, 1989; TANAKA et al., 2007; TANAKA et al., 2014).

Novos modelos de vacina de BCG vêm surgindo nas últimas décadas, com o objetivo comum de aumentar as populações de linfócitos T CD8+, sobretudo para melhorar a resposta (CHEN et al., 2009; Winau et al, 2006). Observamos que o tratamento

com EAB aumentou tanto as populações de linfócitos TCD4+, como CD8+ no linfonodo poplíteo, mostrando que o extrato pode ser utilizado como adjuvante na vacinação com BCG, nos protocolos em que seja necessário aumentar a população de linfócitos T citotóxicos.

O linfonodo é um importante local de proliferação de linfócitos T, sobretudo após aplicação do BCG, serve inclusive para determinar o sucesso da vacinação (TURCOTTE et al., 1978). Os nossos dados mostram que o extrato potencializou essa ação, aumentando tanto linfócitos TCD4+, como TCD8+, e, talvez por isso, também tenha reduzido a inflamação, tanto na fase aguda, como na fase crônica, modulando positivamente a resposta ao BCG.

Assim, a possibilidade de usar um produto natural, via oral, não tóxico e com ação imunomoduladora, pode potencializar o espectro de ação da vacina e reduzir a inflamação e a dor que acompanham esse tipo de vacinação, abrindo novas perspectivas para uso do mesocarpo de babaçu como adjuvante na vacinação com BCG.

## **Conclusões**

O EAB tem efeito anti-inflamatório na resposta inflamatória ao BCG, afetando tanto a fase aguda como a fase crônica e a resposta secundária desencadeada pelo PPD, possivelmente porque o extrato tem ação imunomoduladora pois ao mesmo tempo reduziu a produção de citocinas inflamatórias, aumentou a produção de peróxido de hidrogênio e estimulou a migração de neutrófilos no sangue, e aumentou simultaneamente o número de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no linfonodo próximo ao local do inóculo.

## **Referências bibliográficas**

ABADIE, Valérie et al. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, v. 106, n. 5, p. 1843-1850, 2005.

ACOSTA-RODRIGUEZ, Eva V. et al. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology*, v. 8, n. 9, p. 942, 2007.

ANDERSON, Anthony Bennett; MAY, Peter Herman; BALICK, Michael J. The subsidy from nature: palm forests, peasantry, and development on an Amazon frontier. Columbia University Press, 1991.

ARAI, Ken-ichi et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual review of biochemistry*, v. 59, n. 1, p. 783-836, 1990.

BAGGIOLINI, Marco; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, v. 84, n. 4, p. 1045-1049, 1989.

BAIN, Barbara J. Diagnosis from the blood smear. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 5, p. 498-507, 2005.

CALMETTE, Albert et al. La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG,". Masson et cie, 1927.

CHEN, Crystal Y. et al. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS pathogens*, v. 5, n. 4, p. e1000392, 2009.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860, 2002.

EMMENDÖRFFER, Andreas et al. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *Journal of immunological methods*, v. 131, n. 2, p. 269-275, 1990.

FUJIWARA, Nagatoshi; KOBAYASHI, Kazuo. Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FULTON, Scott A. et al. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infection and immunity*, v. 72, n. 4, p. 2101-2110, 2004.

GREENWALT, T. J.; ALLEN, C. M. A method for counting leukocytes in filtered components. *Transfusion*, v. 30, n. 4, p. 377-379, 1990.

GULD, Johannes et al. Standardization of a new batch of purified tuberculin (PPD) intended for international use. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 19, n. 5, p. 845, 1958.

HEINRICH, Peter C.; CASTELL, Jose V.; ANDUS, Tilo. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical journal*, v. 265, n. 3, p. 621, 1990.

JACKETT, P. S. et al. The contribution of hydrogen peroxide resistance to virulence of *Mycobacterium tuberculosis* during the first six days after intravenous infection of normal and BCG-vaccinated guinea-pigs. *British journal of experimental pathology*, v. 62, n. 1, p. 34, 1981.

KAZATCHKINE, Michel D.; KAVERI, Srinivasa V. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *New England Journal of Medicine*, v. 345, n. 10, p. 747-755, 2001.

KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 3, p. 159, 2013.

KOLLS, Jay K.; LINDÉN, Anders. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

LI, Qitang; VERMA, Inder M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 10, p. 725, 2002.

LONGERBEAM, Jerrold K. et al. Techniques of obtaining and preparing suspensions of spleen and bone marrow for the treatment of supralethally irradiated dogs. *Surgery*, v. 50, n. 1, p. 274-287, 1961.

MAECKER, Holden T. Cytokine flow cytometry. In: *Flow Cytometry Protocols*. Humana Press, 2004. p. 95-107.

MAESTRELLI, Piero et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 152, n. 6, p. 1926-1931, 1995.

MAIA, M. B. S.; RAO, V. S. Anti-inflammatory activity of *Orbignia phalerata* in rats. *Phytotherapy Research*, v. 3, n. 5, p. 170-174, 1989.

MANTOVANI, Alberto et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*

MAY, Peter Herman. Palmeiras em chamas: transformação agrária e justiça social na zona do babaçu. In: *Palmeiras em chamas: transformação agraria e justicia social na Zona do babacu*. EMAPA/FINEP, 1990.

MITTRÜCKER, Hans-Willi et al. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 30, p. 12434-12439, 2007.

NASCIMENTO, Flávia RF et al. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. *Journal of ethnopharmacology*, v. 103, n. 1, p. 53-58, 2006.

PASSOS, Sara T. et al. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *The journal of immunology*, p. ji\_0901843, 2010.

RAY, Avijit; DITTEL, Bonnie N. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 35, p. e1488, 2010

REIS, Mysrayn YFA et al. Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2017, 2017.

ROOT, Harlan D. et al. Diagnostic peritoneal lavage. *Surgery*, v. 57, n. 5, p. 633-637, 1965.

ROOT, Harlan D. et al. Diagnostic peritoneal lavage. *Surgery*, v. 57, n. 5, p. 633-637, 1965.

ROXO, Eliana; SINHORINI, Idércio Luiz; MARIANO, Mário. Evolução das lesões induzidas por micobactérias BCG e por H37RV em hamster (*Mesocricetus auratus*). *Hansenol. Int*, v. 19, p. 19-25, 1994.

SAVILL, J. S. et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *The Journal of clinical investigation*, v. 83, n. 3, p. 865-875, 1989.

SCHAIBLE, Ulrich E. et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature medicine*, v. 9, n. 8, p. 1039, 2003.

SILVA<sup>1</sup>, Mayara Cristina Pinto da et al. Micro/nanopartículas poliméricas e biodegradáveis de mesocarpo de babaçu: ação imunomoduladora na polarização de macrófagos e efeito anti-leishmania. 2017.

SILVA<sup>2</sup>, Osmarina da Paixão; FOCK, Ricardo Ambrosio; ROGERO, Marcelo Macedo. Produção de peróxido de hidrogênio e atividade de enzimas antioxidantes de macrófagos peritoneais em resposta ao BCG (Bacilo de Calmette-guérin) em modelo murínico de desnutrição proteico-energética. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.*, v. 36, n. 3, 2011.

SUTTON, Caroline E. et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from  $\gamma\delta$  T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, v. 31, n. 2, p. 331-341, 2009.

TANAKA, Toshio; NARAZAKI, Masashi; KISHIMOTO, Tadimitsu. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, p. a016295, 2014.

TURCOTTE, R.; LAFLEUR, L.; LABRÈCHE, M. Opposite effects of BCG on spleen and lymph node cells: lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. *Infection and immunity*, v. 21, n. 3, p. 696-704, 1978.

VIEIRA, Sonia. *Análise de variância: ANOVA*. Editora Atlas SA, 2000.

VOGELZANG, Alexis et al. Central Memory CD4<sup>+</sup> T Cells Are Responsible for the Recombinant Bacillus Calmette-Guérin  $\Delta$  ureC:: hly Vaccine's Superior Protection Against Tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, v. 210, n. 12, p. 1928-1937, 2014.

WINAU, Florian et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*, v. 24, n. 1, p. 105-117, 2006.

YAMAMOTO, T., Lasco, T. M., Uchida, K., Goto, Y., Jeevan, A., McFarland, C., & McMurray, D. N. (2007). Mycobacterium bovis BCG vaccination modulates TNF- $\alpha$  production after pulmonary challenge with virulent Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. *Tuberculosis*, 87(2), 155-165.

ZWERLING, Alice et al. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS medicine*, v. 8, n. 3, p. e1001012, 2011.7.

**5. SEGUNDO ARTIGO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E CICATRIZANTE  
DO MESOCARPO DE BABAÇU (*Attalea speciosa*, Mart.)**

Alex Brall Rodrigues Silva;

Rosane Nassar Meireles Guerra

**São Luís**

**2018**



## RESUMO

O babaçu (*Attalea speciosa*, Arecaceae) é uma palmeira nativa do Brasil com grande incidência no Maranhão, onde tem distribuição ampla e densa. Já foi comprovado o efeito imunomodulador na ativação de linfócitos e macrófagos, na produção de anticorpos, bem como as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana. Nesse estudo, avaliamos a atividade anti-nociceptiva e cicatrizante do extrato aquoso do mesocarpo do babaçu (EAB). Para a atividade analgésica, usamos o modelo *Tail flick* e camundongos Swiss, foram distribuídos em 3 grupos com 5 animais cada: Controle negativo: recebeu PBS; Controle positivo: recebeu morfina (30mg/Kg) e Babaçu: tratado com 5mg/kg (EAB). Para avaliar a cicatrização, foi realizada uma lesão de 1cm<sup>2</sup> na região dorsal e os animais foram divididos em 2 grupos (5 animais cada). O controle: recebeu água, via oral e o grupo babaçu: recebeu EAB (5mg/Kg), via oral, durante 16 dias. Os animais foram eutanasiados no 16º dia, para obtenção das células do baço, sangue e peritônio. No teste *Tail flick* a morfina foi mais efetiva que o EAB e PBS no intervalo de 30 minutos. Entretanto, o EAB apresentou efeito similar a morfina nos intervalos subsequentes de 60 e 120 minutos. O EAB não teve efeito na avaliação macroscópica do processo de cicatrização. Entretanto, o tratamento com babaçu aumentou no número de células do baço, sangue e peritônio, indicando um potencial imunoestimulador do extrato. Concluímos que o extrato apresenta ação analgésica e de longa duração, não interfere na avaliação macroscópica do processo de cicatrização, mas estimula a proliferação celular em diferentes sítios no organismo, sugerindo ação imunoestimuladora.

**Palavras-chave:** *Attalea speciosa*. Analgesia. Cicatrização, Imunomodulação, Babaçu

## **ABSTRACT**

The babaçu (*Attalea speciosa*, Arecaceae) is a palm tree native from Brazil with a large incidence in Maranhão, where it is widely distributed. It was previously showed the immunomodulatory effect of babassu mesocarp on the lymphocyte and macrophage activation, antibody production. This product also have anti-inflammatory and antimicrobial activity. It was our aim to investigate the anti-nociceptive and the healing activity of the aqueous extract obtained from the babassu mesocarp (EAB). The anti-nociceptive activity, was evaluated by Tail flick and The Swiss female mice, were distributed in 3 groups with 5 animals each: - Negative control: received PBS; Positive control: treated with morphine (10mg/kg) and Babassu: treated with 5mg/kg (EAB). To evaluate the healing effect, a lesion with 1cm<sup>2</sup> was performed in the dorsal region and the animals were divided into 2 groups (5 animals each): The control- received water orally and - Babassu: treated orally with EAB, during 16 days. The animals were killed after 16 day, when spleen, blood and peritoneum cells. In the Tail flick test, morphine was more effective than the EAB after 60-minute. In contrast, EAB was more effective than morphine at 120 minutes. There was no significant difference in the tissue remodeling process of the EAB group in relation to the control. However, it was possible to detect in the babassu group an increased number of spleen, blood and peritoneum cells, possible due to an immunostimulatory effect of EAB. We conclude that the extract presents moderate analgesic action with long duration, but has no effect on the healing process. In contrast the treatment with EAB exerte an immunostimulatory action on different sites in the organism, since it promotes proliferation and/or migration.

**Keywords:** *Attalea speciosa*, babassu, analgesic activity, healing, Immunostimulati

## Introdução

O babaçu (*Attalea speciosa*, Arecaceae) é uma palmeira nativa do Brasil, com grande incidência no Maranhão, Piauí e Sul do Pará e Tocantins. Tem ampla distribuição e densidade populacional, nos locais onde ocorre, por isso, é considerada uma espécie pioneira, com características dominantes (ROSENTHAL, 1975; PRANCE, 1985; ANDERSON, BALICK 1991).

Algumas partes do fruto do babaçu são bastantes utilizadas na indústria e para fins terapêuticos, como é o caso do óleo e do mesocarpo obtido dos frutos da palmeira de babaçu. O óleo do babaçu é utilizado na indústria alimentícia e cosmética, com importante contribuição ao crescimento econômico no Maranhão, estado em que há maior extração deste recurso natural (PRANCE, 1985; IBGE, 2015;). O mesocarpo é utilizado na produção de pães, como alimento e como medicamento (SOUZA et al, 2011).

Já foi demonstrado *in vivo* a atividade anti-inflamatória utilizando o mesocarpo do babaçu, (SILVA et al, 2001; NASCIMENTO et al, 2010). Dentre os mais variados estudos utilizando o mesocarpo do babaçu, foram comprovados alguns efeitos, como a atividade imunomoduladora (NASCIMENTO et al, 2006; GUERRA et al, 2011; BARROQUEIRO et al, 2016), na produção de anticorpos (BARROQUEIRO et al 2001), na ativação de macrófagos (NASCIMENTO et al, 2006), e também atividade anti-inflamatória (SILVA et al, 2001; NASCIMENTO et al 2010) e antimicrobiana (BARROQUEIRO et al 2016), indicando que esse produto apresenta um grande potencial na prospecção de bioprodutos.

O processo de cicatrização é bastante dinâmico e envolve uma série de processos inflamatórios acompanhados de proliferação celular com remodelamento de tecido. Para que ocorra adequadamente, deve ser orquestrado de forma concatenada tanto do ponto de vista celular como do ponto de vista molecular. Atualmente, divide-se o processo de cicatrização nas fases inflamatória, proliferativa e remodelamento (ARNOLD et al, 2014). Entretanto a presença da lesão, como todo o processo de cicatrização podem resultar em dor, devido ao dano tecidual, em decorrência da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários específicos, os quais transmitem a informação nociceptiva para o cordão espinhal (VERRI et al., 2006).

Muitos produtos naturais são usados na área da saúde, e os resultados dessa utilização tem demonstrado que ainda há um vasto potencial de novas drogas possíveis.

Assim, considerando o efeito anti-inflamatório e imunomodulador do mesocarpo de babaçu, investigamos seu efeito anti-nociceptivo em modelo de dor aguda e na cicatrização de feridas cutâneas.

## **Materiais e métodos**

### **Material vegetal**

A farinha comercial obtida da empresa Flora Maranhense foi solubilizada em água deionizada, para obtenção do extrato bruto aquoso bruto na concentração de 200mg/mL.

A extração ocorreu a partir da maceração por 48 horas, seguida de filtração e concentração sob pressão reduzida e liofilização. Para preparação do extrato final o produto da extração foi pesado e ressuspensionado nas concentrações a serem utilizadas nos experimentos.

A farinha foi submetida à análise de autenticidade, integridade e pureza, por meio de ensaios físico-químicos, e por técnicas cromatográficas utilizando como padrão amostras de mesocarpo de babaçu previamente obtidas em nosso laboratório e armazenadas numa extratoteca. Uma exsiccata do babaçu (N ° 1135) foi depositada no Herbário Ático Seabra, Universidade Federal do Maranhão.

### **Animais**

Foram utilizados 25 camundongos Swiss, fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos sob condições de luz e temperatura definidas e com alimentação e água oferecidos ad libitum. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo CEUA-UFMA, nº 23115.009717/2015-10

### **Indução de dor aguda – tail flick**

Nesse ensaio foram utilizados 15 animais distribuídos em três grupos, com 5 animais cada, da seguinte forma: Controle negativo: recebeu PBS; BABAÇU: recebeu EAB, 5mg/Kg e o grupo MORFINA: recebeu morfina, via intramuscular (10mg/Kg). A resposta aguda a dor espinhal foi avaliada com auxílio de um analgesímetro (D'AMOUR & SMITH, 1941; SMITH et al., 1943).

O tempo de resposta foi quantificado pelo aparelho, sendo o tempo inicial disparado manualmente. O teste iniciou-se com o disparo inicial, e terminou assim que

ao animal mexesse a cauda. Foram avaliados os seguintes intervalos: 0; 30; 60 e 120 minutos. O tempo de resposta correspondeu ao tempo de latência, medida utilizada para quantificar o índice de nocicepção, expresso em PME%, segundo fórmula posposta por TORRES et al. (2001).

$$\text{PME\%} = \frac{\text{Latência pós-tratamento} - \text{latência pré-tratamento}}{\text{Tempo (10) - Latência pré-tratamento} \times 100}$$

### **Efeito do EAB na cicatrização de feridas cutâneas**

Foram utilizados 10 camundongos, divididos em 2 grupos, com 5 animais cada. No dia 0, foi induzida a lesão na pele do dorso de todos os animais. Para isso, os camundongos foram anestesiados, por via intramuscular (ketamina 10%, xilazina 2% e PBS, na proporção 1:2:1). Para realizar a lesão, utilizou-se um marcador de metal, com 1cm<sup>2</sup>. Em seguida, a pele foi removida, e a lesão foi fotografada e esse foi considerado como tempo 0.

Os animais foram distribuídos em dois grupos e tratados por 16 dias, como a seguir: grupo CONTROLE: recebeu água, via oral; BABAÇU: recebeu extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (EAB), via oral, na concentração de 5mg/Kg.

O tamanho da lesão foi determinado com o auxílio de um paquímetro digital, considerando duas medidas: - uma no eixo lateral (direito-esquerdo) e outra no eixo cefalo-caudal. A avaliação que começou no dia 0, foi repetida a cada 2 dias, se estendendo até o 16º dia. Nos mesmos intervalos foram obtidas fotografias, utilizadas para avaliar aspectos macroscópicos da lesão como: inflamação, formação de crosta, remodelação da pele e restauração da pelagem. Ao final do tratamento e avaliação (16º dia), os animais foram eutanasiados para que fossem avaliadas as populações celulares do sangue, baço e peritônio.

### **Coleta do sangue**

O sangue foi obtido por punção retrorbital. Em seguida, 10 µL foram transferidos para tubos contendo Solução de Turk (1:20) e as células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico de luz comum.

Para a contagem diferencial, foi feito um esfregaço sanguíneo. As lâminas foram secas, fixadas com metanol, coradas com Giemsa e a leitura foi feita com o auxílio de um microscópio óptico de luz comum, utilizando óleo de imersão. Foram contados 100 leucócitos e calculadas as percentagens das diferentes populações presentes no sangue, baço e peritônio. O soro foi armazenado em freezer para avaliação da produção de mediadores e ensaios posteriores.

### **Obtenção do lavado peritoneal e baço, contagem total e diferencial das células**

O lavado peritoneal foi obtido a partir da injeção de 5mL de PBS estéril na cavidade peritoneal. Após uma suave massagem o líquido foi retirado com a seringa e agulha, acondicionado em tubos Falcon, centrifugado e corado com Solução de Turk (1/20) para determinar o número total de células.

O baço foi retirado, triturado em um tamiz, com 3mL de PBS, a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 15mL, centrifugada e corada para determinar o número total de células esplênicas com Solução de Turk (1/20).

Para contagem diferencial as células peritoneais e esplênicas foram ajustadas ( $1 \times 10^5$ ), centrifugas em CitoSpin, durante 5 minutos a 800rpm. As lâminas foram coradas com um kit panótico rápido (InstantProv), contendo 2 corantes e 1 fixador. A contagem diferencial dos leucócitos, considerou o percentual das diferentes populações após a contagem de 100 células.

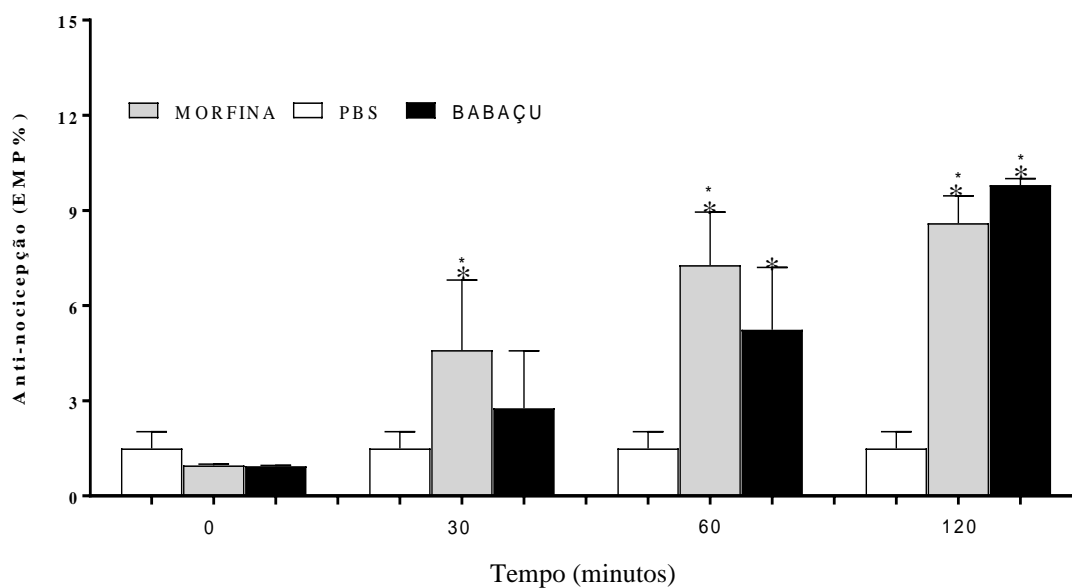
### **Análise estatística**

Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do Software Graph Pad Prism, versão 7.0. Foi usada a análise de variância (ANOVA) *One way*, seguida do teste de Tukey- Kramer, para comparações múltiplas e o teste t de Student para a comparação entre dois grupos. Em todas as análises foi considerado como nível de significância  $p \leq 0,05$ . Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, considerando o número de cinco animais por grupo.

## Resultados

O EAB apresentou ação anti-nociceptiva central

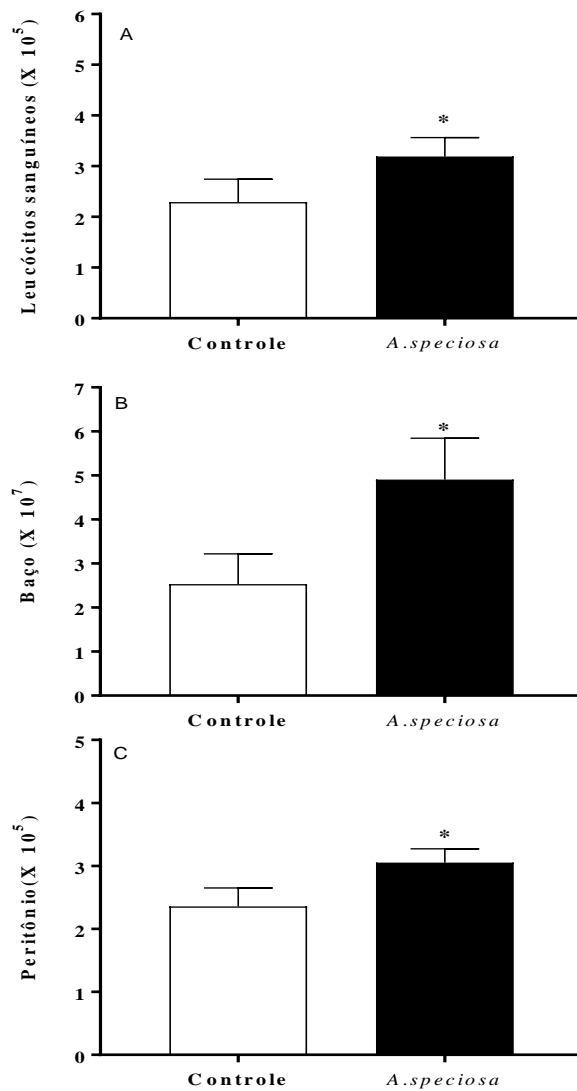
A **Figura 1** mostra que o pré-tratamento com EAB resultou em efeito anti-nociceptivo central a partir de 60 minutos, já que a resposta do grupo babaçu foi semelhante ao grupo PBS no intervalo de 30 minutos. Assim, nos intervalos de 60 e 120 minutos o EAB mostrou eficácia similar a morfina.



**Figura 1: Efeito anti-nociceptivo do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (EAB) em camundongos Swiss, fêmeas, distribuídos nos seguintes grupos: MORFINA: que recebeu morfina 10 mg/Kg, via intraperitoneal; BABAÇU: tratado com EAB (5mg/Kg), via oral e PBS: recebeu PBS via oral. Foram feitas leituras nos intervalos de 30; 60 e 120 minutos após a administração do tratamento. Os dados representam a média de 5 animais/grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.**

## Efeito imunoestimulador de EAB

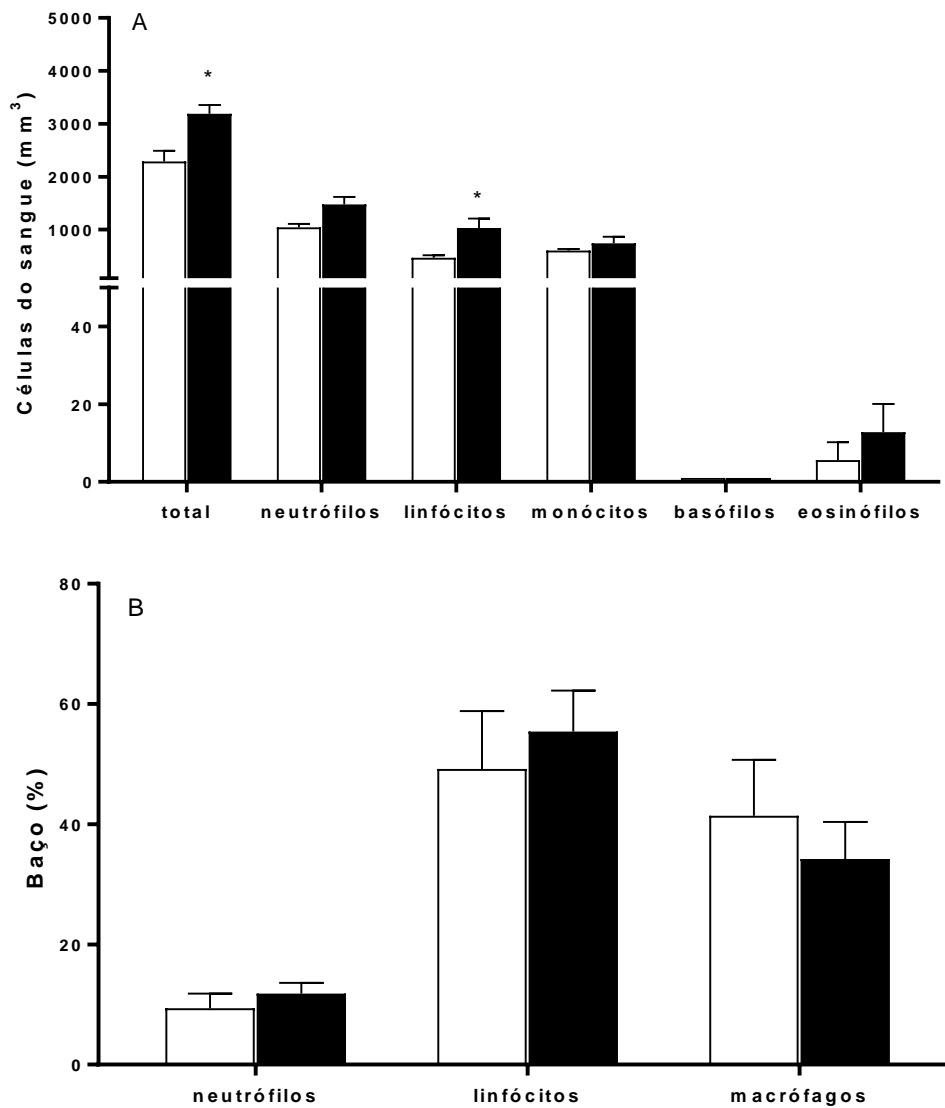
O tratamento com EAB aumentou o número de células de baço (Figura 3A), sangue (Figura 3B) e peritônio (Figura 3C).



**Figura 2:** Efeito do EAB na migração e/ou proliferação celular no sangue (A), baço (B) e peritônio (C) em camundongos Swiss, fêmeas, distribuídos nos seguintes grupos; *A. speciosa*: tratado com EAB (5mg/Kg), via oral e PBS: recebeu PBS via oral. Os dados representam a média de 5 animais/grupo. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



A contagem diferencial no sangue (Figura 3A) mostrou que o tratamento com babaçu aumentou o número total de leucócitos e o de linfócitos, sem afetar o percentual de monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos. A Figura 3B mostra que no baço nenhuma população celular foi afetada pelo tratamento com EAB.

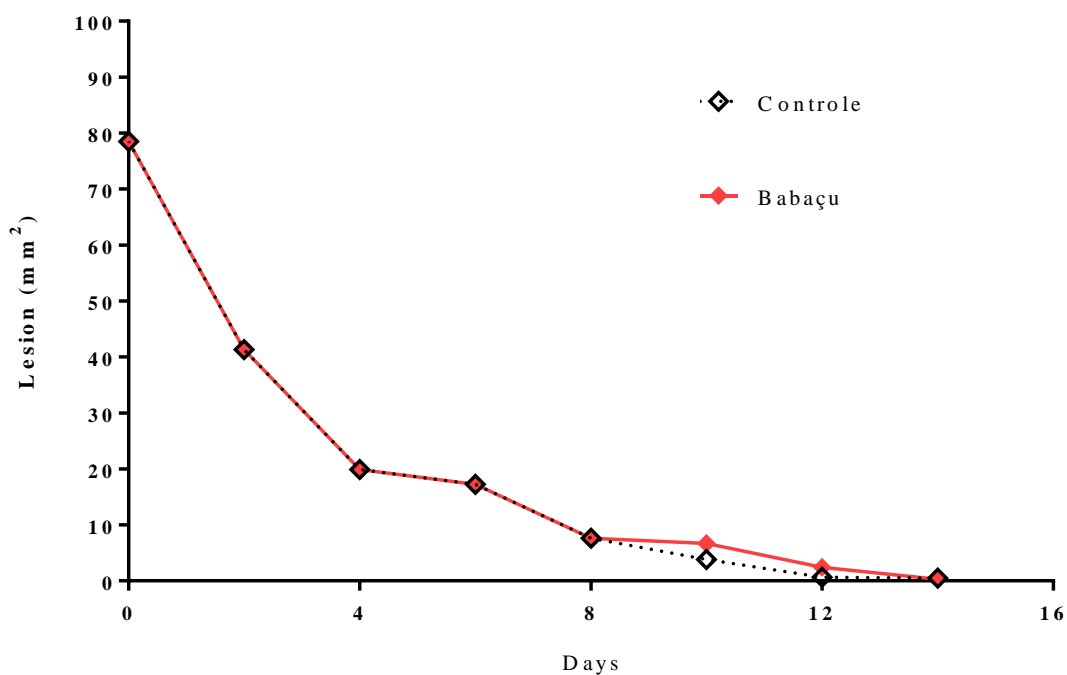


**Figura 3: Contagem diferencial de leucócitos sanguíneos (A) e células esplênicas (B) em camundongos Swiss, fêmeas, distribuídos nos seguintes grupos: BABAÇU: tratado com EAB (5mg/Kg), via oral e PBS: recebeu PBS via oral. Os dados representam a média de 5 animais/grupo. (\*) p < 0,05 em relação ao grupo controle.**

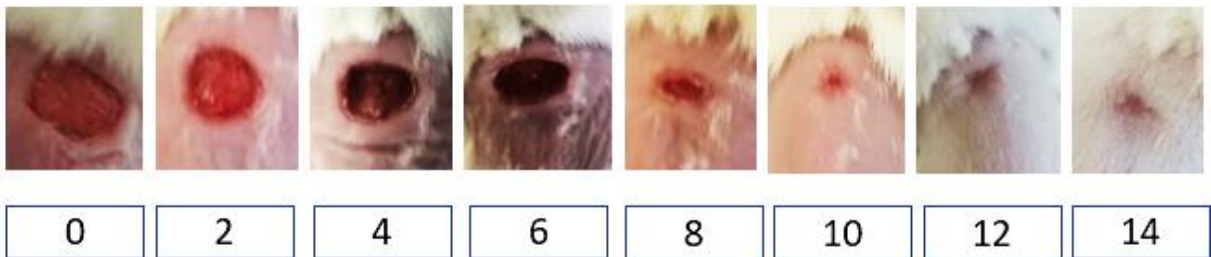
## Ausência de efeito do EAB na cicatrização

A figura 4 mostra os resultados da cicatrização obtidos por fotografia (Figura 4A) e medidas da área da lesão (Figura 4B), durante os 16 dias. No grupo EAB, a velocidade de cicatrização foi semelhante ao grupo controle.

O extrato não acelerou a cicatrização nem reduziu a reação inflamatória, segundo avaliação macroscópica da área de lesão. Nos dois grupos ocorreu redução da lesão, a partir do 2º dia. No 4º dia, além da diminuição da lesão, ocorreu também o início da formação de crosta e diminuição da inflamação, iniciando efetivamente o processo de cicatrização propriamente dito. No 6º dia, foi possível observar a expansão do tecido de granulação nos dois grupos. Nos dias 8 e 10 o tamanho da ferida reduziu de forma mais acentuada, e no dia 12 a ferida fechou completamente. No dia 12, houve início do processo de reestabelecimento da pele, que se estendeu até o dia 16.



### Grupo controle



### Grupo EAB



**Figura 4. Evolução macroscópica das feridas cutâneas em animais tratados com extrato aquoso do mesocarpo de babaçu**, medidas da lesão (A); fotografias da área lesionada (B). Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, para indução da lesão cutânea na região dorsal. Em seguida os animais foram distribuídos em dois grupos: - EAB: recebeu via oral, extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (5mg/Kg/dia), via oral, durante 16 dias e - Controle que recebeu PBS nesse período. O tamanho da lesão foi medido de dois em dois dias, durante 16 dias. Os resultados se referem a média + SD, de 5/grupo. As fotos se referem a evolução das feridas de um animal, escolhido por sorteio, em cada um dos grupos.

### Discussão

Na analgesia, o EAB se mostrou efetivo a partir de 60 minutos, com ação semelhante a morfina, sugerindo um potencial anti-nociceptivo do extrato. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinheiro et al (2002), ao investigarem, em vários modelos, a ação, anti-nociceptiva periférica e central, das frações etanólica e di-cloro-metano do extrato das folhas de *Orbignya speciosa*, usando vários modelos. Esses autores atribuíram a atividade anti-nociceptiva à presença de apigenina, já que esse flavonoide foi capaz de reverter o quadro. Dessa forma, sugerimos que de igual forma, a atividade observada possa estar relacionada a apigenina, devido as múltiplas atividades que esse produto apresenta.

Importa mencionar que o tratamento oral com EAB aumentou no número total de leucócitos sanguíneos e de células do baço e peritônio, mostrando atividade imunostimuladora para esse tratamento.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com EAB, na dose utilizada, não foi citotóxico, corroborando com outros estudos que utilizaram a mesma dose (5mg/kg) e também mostraram que EAB não alterou a viabilidade celular, mas aumentou o número de células do baço, peritônio e sangue, sugerindo uma ação imunoestimuladora e/ou imunomoduladora para o extrato semelhante ao descrito antes (NASCIMENTO et al 2006; BARROQUEIRO et al 2010; BARROQUEIRO et al, 2016)

Os compostos do EAB que induzem essa proliferação ainda não foram identificados, mas, é importante ressaltar que o extrato em doses mínimas consegue modular de forma positiva e sistêmica populações celulares do sistema imune, pois o peritônio e o baço são importantes sítios de ativação e proliferação de células do sistema imune. Esses resultados são promissores e mostram que, o extrato atua de forma sistêmica regulando positivamente o sistema imune, quanto a proliferação celular.

A prospecção fitoquímica realizada por BARROQUEIRO et al, (2016) mostrou que o mesocarpo de babaçu apresenta em sua composição, além dos carboidratos, saponinas, flavonoides e taninos. Plantas ricas em taninos são empregadas no tratamento de diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, e processos inflamatórios em geral. Os flavonoides, como a apigenina, são compostos com ação antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana entre outras. (SIMÕES, 2007), compostos que poderiam estar associados as várias atividades imunológicas já identificadas para o mesocarpo de babaçu.

Na cicatrização, quando analisamos a evolução das feridas, não detectamos diferenças entre os grupos EAB e grupo controle, pois os dois grupos tiveram velocidade de cicatrização muito parecida até o 10º dia. A partir daí o grupo controle teve uma leve melhora em relação ao EAB. Com base nesses dados, podemos concluir que, o EAB não acelerou o processo de cicatrização e nem teve efeito na remodelação tecidual, mostrando que o extrato não apresentou ação cicatrizante no modelo utilizado, embora já tenha apresentado atividade em doses de 80mg/kg utilizando camundongos da linhagem C57Bl/6 (MACIEL, 2007).

Todavia, considerando o efeito anti-inflamatório e imunomodulador descritos (SILVA et al, 2001; NASCIMENTO et al., 2006; NASCIMENTO et al, 2010; GUERRA et al 2011; BARROQUEIRO et al, 2016), inferimos que o extrato pode ter potencial remodelador tecidual em outros modelos de cicatrização, ou em outra linhagens de

camundongos, uma vez que os resultados já demonstrados na literatura estão intimamente relacionados ao processo de cicatrização, e podem estimular esse processo.

### **Conclusões**

O EAB apresenta ação anti-nociceptiva, de longa duração, pois animais tratados com o extrato tiveram resultados semelhantes a morfina, sugerindo um potencial analgésico central do extrato. Na cicatrização, quando analisamos a evolução das feridas, não detectamos diferenças associadas ao EAB em relação ao grupo controle. Entretanto, ocorreu aumento no número total de leucócitos sanguíneos e de células do baço e peritônio, mostrando atividade imunoestimuladora para esse tratamento.

### **Referências bibliográficas**

AGITA, Arisya; ALSAGAFF, M. Thaha. Inflammation, immunity, and hypertension. *Acta Med Indones*, v. 49, p. 158-65, 2017.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, v. 8, n. 4, p. 310-322, 2001.

ANDERSON, AB; MAY PH; BALICK MJ. The subsidy from nature: palm forests, peasantry, and development on an Amazon frontier. Columbia University Press, 1991.

BARROQUEIRO, ESB et al. Efeito do tratamento com mesocarpo de babaçu sobre a produção de Anticorpos para o hormônio tireoidiano-tiroxina. *Revista do Hospital Universitário*, p. 25, 2001.

BARROQUEIRO, ESB et al. Immunomodulatory and antimicrobial activity of babassu mesocarp improves the survival in lethal sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, 2016.

BOKA, G. et al. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, v. 172, n. 1-2, p. 151-154, 1994.

COPRAY, J. C. V. M. et al. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *Journal of neuroimmunology*, v. 118, n. 2, p. 203-211, 2001.

DA SILVA, Bernadete Pereira; PARENTE, José Paz. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.

D'AMOUR, FRED E. et al. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 72, n. 1, p. 74-9, 1941.

DELEO, Joyce A. et al. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 16, n. 9, p. 695-700, 1996.

DING, Aihao H.; NATHAN, Carl F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

EDDY, Nathan B.; LEIMBACH, Dorothy. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

GABAY, Cem; KUSHNER, Irving. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England journal of medicine*, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GUERRA, Rosane NM et al. Babassu aqueous extract (BAE) as an adjuvant for T helper (Th) 1-dependent immune responses in mice of a Th2 immune response-prone strain. *BMC immunology*, v. 12, n. 1, p. 13, 2011.

HENDERSHOT, L. C.; FORSAITH, Janet. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 125, n. 3, p. 237-240, 1959.

HIROTA, Hisao et al. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *Journal of Experimental Medicine*, v. 183, n. 6, p. 2627-2634, 1996.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, *Produção da Extração Vegetal e Silvicultura*, ISS 0103-8435. Rio de Janeiro, v. 30, p.1-48, 2015.

KLEIN, Michael A. et al. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*, v. 19, n. 3, p. 227-233, 1997.

MACIEL, M. C. G. et al. Avaliação do efeito cicatrizante do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) em feridas de pele induzidas em camundongos. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 9, p. 1-4, 2007.

NASCIMENTO, Flávia RF et al. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. *Journal of ethnopharmacology*, v. 103, n. 1, p. 53-58, 2006.

PRANCE GT. *Manual de Botânica do 9. Maranhão*. Gráfica Universitária da Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Maranhão, 1985.

ROBBINS, Stanley L. et al. *Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional*. In: *Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional*. 2001.

ROSENTHAL FRT. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. *Rev Bras Tecnol*, v. 6, p. 6-29, 1975.

SMITH, DONN L.; D'AMOUR, Marie C.; D'AMOUR, FRED E. The analgesic properties of certain drugs and drug combinations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 77, n. 2, p. 184-193, 1943.

SOMMER, Claudia; SCHMIDT, Christine; GEORGE, Annette. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Experimental neurology*, v. 151, n. 1, p. 138-142, 1998.

SOUSA, Luís Henrique Albuquerque et al. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. *Revista de Ciências da Saúde*, 2012.

FISHER, Ronald A. *Statistical methods for research workers* Oliver and Boyd. Edinburgh, Scotland, v. 6, 1925.

TODA, Masao et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, n. 4, p. 875-881, 2003.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

ANDERSON, James M. Inflammation, wound healing, and the foreign-body response. In: Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition. Elsevier Inc., 2013.

FIELDS, H. L. Central nervous system mechanisms of pain modulation. Textbook of pain, 1999.

KIM, Min-Ho et al. Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. Journal of Investigative Dermatology, v. 128, n. 7, p. 1812-1820, 2008.

BARROQUEIRO<sup>1</sup>, Elizabeth de Sousa Barcelos et al. Efeito do tratamento com mesocarpo de babaçu sobre a produção de Anticorpos para o hormônio tireoidiano-tiroxina. Revista do Hospital Universitário, p. 25.

SCHULTZ, Gregory; CLARK, Warren; ROTATORI, D. Scott. EGF and TGF- $\alpha$  in wound healing and repair. Journal of cellular biochemistry, v. 45, n. 4, p. 346-352, 1991.

ZAJAC, Allan J. et al. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Current opinion in immunology, v. 10, n. 4, p. 444-449, 1998.

LINGEN, Mark W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. Archives of pathology & laboratory medicine, v. 125, n. 1, p. 67-71, 2001.

FORTES, T. S. et al. Desenvolvimento do Tumor de Ehrlich em Camundongos após incubação in vitro com mesocarpo de babaçu. Revista de Ciências da Saúde, v. 11, p. 11-18, 2009.

ALEXOPOULOU, Annika N.; MULTHAUPT, Hinke AB; COUCHMAN, John R. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. The international journal of biochemistry & cell biology, v. 39, n. 3, p. 505-528, 2007.



GUERRA, Rosane NM et al. Babassu aqueous extract (BAE) as an adjuvant for T helper (Th) 1-dependent immune responses in mice of a Th2 immune response-prone strain. *BMC immunology*, v. 12, n. 1, p. 13, 2011.

KOH, Timothy J.; DIPIETRO, Luisa Ann. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 13, 2011.

SCHRODER, Kate et al. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

CAVALLARI, Marcelo Mattos; TOLEDO, Marcos Miranda. What is the name of the babassu? A note on the confusing use of scientific names for this important palm tree. *Rodriguésia*, v. 67, n. 2, p. 533-538, 2016.

MAYER, David J.; PRICE, Donald D. Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain*, v. 2, n. 4, p. 379-404, 1976.

HAVRANKOVA, Jana; ROTH, Jesse; BROWNSTEIN, MICHAEL. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, v. 272, n. 5656, p. 827, 1978.

ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.

DVORAK, Harold F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology*, v. 146, n. 5, p. 1029, 1995.

TETTA, Ciro et al. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 49, n. 9, p. 665, 1990.

DA SILVA, Bernadete Pereira; PARENTE, José Paz. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.

ADAMS, William G. et al. Decline of childhood Haemophilus influenzae type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *Jama*, v. 269, n. 2, p. 221-226, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. Estimated influenza illnesses and hospitalizations averted by influenza vaccination-United

States, 2012-13 influenza season. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 62, n. 49, p. 997, 2013.

BARROQUEIRO, Elizabeth SB et al. Immunomodulatory and antimicrobial activity of babassu mesocarp improves the survival in lethal sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, 2016.

SILVA, CG da et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, v. 52, n. 3, p. 229-233, 2005.

NASCIMENTO, Flávia RF et al. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. *Journal of ethnopharmacology*, v. 103, n. 1, p. 53-58, 2006.

PINHEIRO, Mariana Martins Gomes; BOYLAN, Fábio; FERNANDES, Patrícia Dias. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart.(Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin. *Life sciences*, v. 91, n. 9-10, p. 293-300, 2012.

WEDMORE, Caroline V.; WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature*, v. 289, n. 5799, p. 646, 1981.

BANNENBERG, Gerard; SERHAN, Charles N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, n. 12, p. 1260-1273, 2010.

RANKIN, James A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care*, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

LAMONT, Leigh A.; TRANQUILLI, William J.; GRIMM, Kurt A. Physiology of pain. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

ZWERLING, Alice et al. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS medicine*, v. 8, n. 3, p. e1001012, 2011.

FERREIRA, E. *Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2010.

RAINSFORD, K. D.; CONSENSUS REPORT GROUP ON NIMESULIDE. Nimesulide—a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and

clinical consensus. *Current medical research and opinion*, v. 22, n. 6, p. 1161-1170, 2006.

BONICA, J. J. *Biochemistry and modulation of nociception and pain. The management of pain*, p. 95-121, 1990.

MEYER, Richard A. *Peripheral neural mechanisms of nociception. Textbook of pain*, 1994.

AZEVEDO, Ana Paula S. et al. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n. 1, p. 155-159, 2007.

CORRÊA, Manuel Pio. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. In: *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Imprensa Nacional Brasília, 1984.

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

ISHIHARA, Katsuhiko; HIRANO, Toshio. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 13, n. 4-5, p. 357-368, 2002.

BALDEZ, Raimundo Nonato et al. Healing of colonic anastomosis with the use of extract aqueous of *Orbignya phalerata* (Babassu) in rats. *Acta cirurgica brasileira*, v. 21, p. 31-38, 2006.

BATISTA, Clelma Pires et al. Efeito do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização do estômago em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, n. Supl 3, p. 26-32, 2006.

BRITO FILHO, Sebastião Barreto de et al. Analysis of healing in the Alba Linea with the use of *Orbignya phalerata* (babassu) water extract: controlled study in rats. *Acta cirurgica brasileira*, v. 21, p. 76-88, 2006.

ROSENTHAL, F. R. T. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. *Rev Bras Tecnol*, v. 6, p. 6-29, 1975.

PEREIRA, Susan M. et al. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. *Revista de saude publica*, v. 41, p. 59-66, 2007.

DE OLIVEIRA LIMA, José Renato et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LIMA, Cleide G. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). *Rev. Bras. Farm.*, v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.

PLONER, Markus et al. Pain processing is faster than tactile processing in the human brain. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 42, p. 10879-10882, 2006.

CAVALLARI, Marcelo Mattos; TOLEDO, Marcos Miranda. What is the name of the babassu? A note on the confusing use of scientific names for this important palm tree. *Rodriguésia*, v. 67, n. 2, p. 533-538, 2016.

GRINNELL, Frederick. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in cell biology*, v. 13, n. 5, p. 264-269, 2003.

## **7. ANEXOS**

### **7.1. Anexo 1 – Normas da revista para a publicação dos artigos**



## NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

### REVISTA ELETRÔNICA CIENTÍFICA DA UERGS

A Revista Eletrônica Científica da UERGS tem por finalidade publicar trabalhos de natureza científica, técnica/tecnológica e de extensão, que abordem temas relevantes nas áreas de humanas, engenharias e vida e meio ambiente, tendo caráter multidisciplinar, de forma a contribuir para o desenvolvimento da ciência no Brasil e no exterior.

Todas as contribuições científicas enviadas para publicação serão submetidas à apreciação do Editor Chefe, Membros do Corpo Editorial e Revisores Convidados, reservando-se à Revista o direito de recusar o artigo considerado insuficiente ou que esteja em desacordo com os princípios e normas da revista. Após o aceite do trabalho, os direitos de publicação passam a ser da Revista Eletrônica Científica da UERGS, inclusive traduções, figuras e outros.

No momento da submissão será solicitada uma carta de apresentação, que deverá explanar sucintamente a relevância do trabalho, contendo também declaração de que o trabalho não foi publicado ou submetido a outro periódico. Nesta carta, ainda, solicita-se que os autores sugiram ao menos 3 (três) revisores potenciais do manuscrito, com sua filiação e e-mail para contato.

A Revista aceita submissões em português, inglês ou espanhol de:

- 1) **Artigos Inéditos:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico. O documento não deve exceder 10.000 palavras.
- 2) **Artigos de Revisão:** aborda revisão bibliográfica ou estado da arte de tema de interesse comum relacionado ao escopo da Revista. O documento não deve exceder 20.000 palavras.
- 3) **Notas Curtas ou Comunicações Breves:** experiências originais, cuja relevância para o conhecimento do tema justifique a apresentação de dados iniciais de pequenas séries. O documento não deve exceder 5.000 palavras.



Reitoria  
Rua Sete de Setembro, 1156. CEP: 90.010-191  
Centro Histórico - Porto Alegre/RS  
(51) 3288-9000 | [www.uergs.edu.br](http://www.uergs.edu.br)

- 4) **Nota Técnica:** é um artigo elaborado por técnico (os) especializado (os) em determinado assunto, devendo conter fundamentação teórica ou análise completa de todo o contexto. O documento não deve exceder 5.000 palavras.
- 5) **Artigos de Dados:** apresentam vasto conjunto de dados, acompanhados por metadados que descrevem o conteúdo, contexto, qualidade e estrutura dos dados. O documento não deve exceder 10.000 palavras.
- 6) **Editoriais** sobre temas específicos serão publicados mediante convite do Editor Chefe.

### PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

Os manuscritos devem ser submetidos unicamente via online pelo site [www.seer.com.br/rev\\_uergs](http://www.seer.com.br/rev_uergs). O formato a ser submetido o trabalho deve seguir o exemplo **em anexo** (*hiperlink*) e formatado em Word for Windows versão 98 ou superior.

Todos os manuscritos submetidos para avaliação devem conter os seguintes itens: Título, Resumo (escrito na língua portuguesa, não excedendo 250 palavras), Palavras-chave (ao menos 3 e no máximo 5), Abstract (escrito na língua inglesa, não excedendo 250 palavras), Keywords (ao menos 3 e no máximo 5), Introdução, Materiais e Métodos/Metodologia, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências. Os itens Introdução, Materiais e Métodos/Metodologia, Resultados e Discussão, Conclusão devem ser numerados sequencialmente com números arábicos, assim como seus possíveis subitens.

Em trabalhos que envolvam seres humanos, animais ou com manipulação genética, os autores deverão informar na seção Materiais e Métodos/Metodologia os aspectos éticos da pesquisa com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, em consonância com a Declaração de Helsinki (<<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>>). Trabalhos sem aprovação de Comitê de Ética não serão aceitos para a publicação.

Gráficos e tabelas devem ser inseridas no texto de acordo com a ordem em que são citadas e numeradas sequencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e abaixo da figura, devendo ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. As imagens devem ser inseridas no texto com resolução mínima de 300dpis.



Referências no texto devem seguir o padrão ABNT (NBR6023). Citações deverão seguir o padrão ABNT (NBR10520).

Citações indiretas com indicação de autoria no texto, seguem o exemplo “Pereira (1999)”; Citações indiretas com indicação de autoria no final da citação, seguem o exemplo (SILVA, 1999) ou (SILVA; SOUZA; CARVALHO, 1998) ou (SILVA *et al.*, 1999); citações diretas curtas (de até três linhas) com indicação de autoria no texto, seguem o exemplo: Segundo Silva (2012, p.5) a campanha é “fundamental para o desenvolvimento”; citações longas (com mais de 3 linhas) devem ser escritas em um bloco recuado 4cm da margem esquerda, com espaçamento simples e fonte 10, sem aspas. Exemplo:

Segundo Silva *et al.* (2013, p. 38):

A lombada é um elemento opcional utilizado apenas quando há encadernação (exceto no caso de espiral). Sua construção deve ser realizada com base na NBR12225 - Informação e Documentação - lombada - Apresentação. Na Uergs, o Sistema de Bibliotecas recomenda que na lombada conste o nome do aluno na vertical, de cima para baixo [...]

As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em espaçamento simples e separadas entre si por um espaço simples, em ordem crescente de data de publicação. Levar em consideração as seguintes ocorrências:

**Artigo de periódico:**

SOBRENOME DO AUTOR, Iniciais do nome do autor. **Título.** Revista, cidade da publicação, volume, número, páginas, Mês de publicação. Ano de publicação.

**Livro:**

SOBRENOME DO AUTOR, Iniciais do nome do autor. **Título:** subtítulo. Local: Editora, ano.

**Capítulo de livro:**

SOBRENOME DO AUTOR, Iniciais do nome do autor do capítulo. Título do capítulo. In: SOBRENOME, Iniciais do nome do autor. **Título da publicação no todo.** Edição. Local de publicação: editora, ano. página inicial-final da parte referenciada.

**Tese ou Dissertação:**





SOBRENOME DO AUTOR, Iniciais do nome do autor. **Título:** subtítulo. Ano apresentação do trabalho. Número de folhas. Indicação de dissertação ou tese (Grau ou área de concentração) - indicação de faculdade, Universidade (por extenso), Local. Ano de conclusão.

**Trabalhos apresentados em Eventos:**

SOBRENOME, Iniciais do nome do autor. Título do trabalho. In: NOME DO EVENTO, edição do evento (se houver), ano, local (cidade) de realização. **Título...**, local de publicação: editora, data da publicação. página inicial-final.

Para documentos eletrônicos, acrescentar no final das referências, as informações: Disponível em: <endereço eletrônico>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano.

### AVALIAÇÃO DOS MANUSCRITOS PELOS PARES

Todos os manuscritos enviados à Revista serão avaliados por dois revisores *ad hoc*, cujos nomes serão mantidos em sigilo. Caso haja discrepância entre as avaliações, um terceiro revisor será consultado. O Editor Chefe da Revista, de posse desses dados, tomará a decisão final. Quando forem sugeridas modificações, estas serão encaminhadas ao autor correspondente para resposta e, em seguida, encaminhadas aos revisores para verificarem o cumprimento das exigências e solicitações.

As instruções devem ser seguidas integralmente. O aceite final do manuscrito é de atribuição do Editor Chefe, sendo artigos que não estejam de acordo com as instruções serão prontamente rejeitados. Casos omissos serão deliberados pelo Corpo Editorial e Conselho Editorial da Revista Científica Eletrônica da Uergs.

