

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VITOR AUGUSTO FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITO ANTI-DIABETES, CICATRIZANTE, ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DE**

***Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís,

2018

VITOR AUGUSTO FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITO ANTI-DIABETES, CICATRIZANTE, ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DE**

***Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy**

Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Maranhão para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

São Luís,

2018

Santos, Vitor Augusto Ferreira dos
EFEITO ANTI-DIABETES, CICATRIZANTE, ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DE *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy/
Vitor Augusto Ferreira dos Santos. – 2018. 63 f.

Orientadora: Rosane Nassar Meireles Guerra
Monografia (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Vismia Guianensis. 2. Cicatrização. 3. Anti-inflamatório

VITOR AUGUSTO FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITO ANTI-DIABETES, CICATRIZANTE, ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DE**

***Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy.**

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Ms. Luís Douglas Miranda da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Wanderson Pereira da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Universidade Federal do Maranhão

DEDICATÓRIA

A Deus, A minha mãe Marineide, por todos os ensinamentos transmitidos, pela educação, amor, humildade, confiança e tudo aquilo que as palavras não podem traduzir neste momento especial da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me providenciar esta oportunidade, me capacitando rumo aos meus objetivos profissionais e por me dar saúde, fé, força e sabedoria para o cumprimento desta missão.

À minha querida orientadora Professora Dra. Rosane Nassar Guerra, por ter me aceitado como orientando, por todo apoio, ajuda e suporte técnico, moral e financeiro para concretizar o projeto de monografia. Pela amizade e confiança no meu trabalho e pelos incentivos. Professora Rosane Guerra você é um exemplo de pessoa e profissional, tenho grande admiração por você! Obrigado por tudo!

Aos meus pais Marineide Louzeiro e Cláudio Moraes e meu padrasto Cleiton Avelar, aos meus avós maternos Ana lize Louzeiro e José Ribamar, pelo amor, suporte e pela boa educação e criação que me deram.

Agradeço aos meus irmãos André Felipe e Cláudio Moraes Junior, as minhas tias Marilete Louzeiro e Kátia Cilene, pelo carinho e incentivo aos meus estudos.

Aos meus amigos, em especial, Aldilene Silva, Daniele Franco, Sianne Pantoja, Alex Brall, Sianne Pantoja, Joubberth, Thiago Wander, obrigado por cada momento de descontração, pelas palavras de encorajamento e paciência.

A todos do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão com quem pude aprender e ganhar experiência profissional.

A todos os professores que contribuíram para minha formação e sempre se disponibilizaram em ajudar no que precisei.

Obrigado a todos!

*Vou instruir você, indicando o caminho a seguir.
Com os olhos sobre você, eu serei o seu conselheiro.”
(Salmo 32:8)*

RESUMO

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy é uma espécie vegetal arbustiva conhecida, como lacre. Na literatura existe diversos relatos da ação farmacológica da espécie frente à microrganismos, ação antitumoral, laxante. O presente estudo investigou o efeito de *V. guianensis* na diabetes *in vitro* e os efeitos cicatrizante, analgésico e anti-inflamatório *in vivo*. Utilizou-se o extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis* (EHVG). O tratamento com EHVG foi feito com 5 mg/Kg, via oral em todos os ensaios. Camundongos Swiss, fêmeas, foram divididos em grupos de 5 animais. Os controles negativos receberam salina, via oral. Na avaliação da cicatrização a indução de ferida foi feita por excisão de pele nos grupos Controle e EHVG e os animais foram tratados por 15 dias e avaliados a cada dois dias nesse período. O efeito analgésico foi avaliado por *Tail flick*, nos intervalos de 30; 60 e 120 minutos após o tratamento (grupos EHVG, Controle e Morfina). O efeito anti-inflamatório foi avaliado em animais tratados 30 dias após a aplicação de BCG, no coxim plantar, e o desafio com 21 dia com PPD (grupos EHVG e BCG). O EHVG apresentou atividade inibidora para as enzimas α -amilase e α -glicosidase semelhante a arcabose usada como controle positivo. O EHVG não acelerou o processo cicatricial, entretanto, a retração da lesão foi mais evidente do grupo tratado com o extrato. O EHVG teve ação anti-nociceptiva comparável a morfina nos intervalos de 60 e 90 minutos. Na resposta inflamatória o EHVG apresentou efeito tanto na fase aguda como crônica, com repercussão na ativação de linfócitos TCD4+ no peritônio e no linfonodo poplíteo, onde também aumentou os linfócitos TCD8+. O EHVG não alterou a produção de peróxido de hidrogênio e citocinas. Concluímos que o EHVG apresentou efeito anti-diabetes, analgésico e anti-inflamatório, mas não afetou cicatrização, sugerindo que o extrato é uma promissora fonte de moléculas bioativas.

Palavras-Chave: *Vismia guianensis*, anti-nocicepção, anti-inflamatório; lacre; BCG; Linfócitos T.

ABSTRACT

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy is a shrubby plant species known as sealing wax. In the literature there are several reports of the pharmacological action of the species against microorganisms, antitumor action, laxative. The present study investigated the effect of *Vismia guianensis* the anti-diabetes, healing, analgesic and anti-inflammatory effects. The leaves were dried, crushed and macerated in alcohol 70% to obtain the hydroalcoholic extract (EHVG). Female Swiss mice were divided in groups of 5 animal each. All negative controls group always received saline solution. The animals treated with EHVG received 5mg/Kg, orally. The wound was induced by excision of skin and control and EHVG groups were treated during 15 days. The anti-nociceptive effect was evaluated by Tail flick in animals treat once with EHVG (5mg/Kg), Morphine (10mg/Kg) and saline. The anti-inflammatory effect was evaluated after the BCG injection on the footpad, on day 0 and PPD, on day 21. EHVG show a high inhibitory effect on α -amylase α -glycosidase similar to arcabose used as positive control. The EHVG did not affect the cicatricial process in mice. Although, the lesion was more retracted in the group treated with the extract. EHVG showed an analgesic activity similar to morphine at the later periods (60 and 90 min). EHVG also showed an anti-inflammatory activity either at acute or chronic phase, increasing the TCD4+ population at the popliteo lymph node and peritoneum. At peritoneum the TCD8+ was also increased. Instead, no effect was detected on H2O2 and cytokine production. We conclude that the EHVG has an analgesic and anti-inflammatory activity and for this reason it is an important target to bioprospecting new products.

Keywords: *Vismia guianensis*, healing, anti-nociceptive, anti-inflammatory; lacre; BCG; T Lymphocytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da distribuição da espécie <i>Vismia guianensis</i> no Brasil.....	25
Figura 2	Folhas e tronco de <i>Vismia guianensis</i>	26
Figura 3	Folhas (A), flores (B), fruto (C) de <i>Vismia guianensis</i>	27
Figura 4	Efeitos da administração oral do extrato hidroalcoólico de <i>Vismia guianensis</i> , na evolução da cicatrização das feridas cutâneas.....	38
Figura 5	Efeito anti-nociceptivo do extrato das folhas de <i>Vismia guianensis</i>	39
Figura 6	Efeito do EHVG no número total de células no sangue (A), no baço (B) e no peritônio (C) de camundongos em processo de cicatrização	40
Figura 7	Efeito do EHVG nas populações de leucócitos no sangue (A), baço (B) e peritônio (C) de camundongos em processo de cicatrização	41
Figura 8	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) Choisy, sobre o edema de pata induzido por BCG....	42
Figura 9	Efeito do EHVG no número total de células no linfonodo poplíteo (A) e baço (B) de camundongos com edema de pata por BCG.....	43
Figura 10	Efeito do EHVG no número total e diferencial de células no sangue de camundongos com edema de pata por BCG.....	44
Figura 11	Efeito do EHVG no número total e diferencial de células no peritônio de camundongos com edema de pata por BCG.....	45
Figura 12	Marcação de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do linfonodo poplíteo pelo método de imunofenotipagem.....	46
Figura 13	Marcação de macrófagos do peritônio pelo método de imunofenotipagem.....	47
Figura 14	Efeito do tratamento profilático com EHVG sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e citocinas no sangue.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de dois fitoterápicos de uso registrado na Anvisa.....	22
Tabela 2	Painel de marcação para células peritoneais e do linfonodo poplíteo.....	34
Tabela 3	Efeito do extrato das folhas de <i>Vismia fujianensis</i> na inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase.....	36

ABREVIATURAS e SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária,
BCG	Bacilo Calmette Guerin
CM	Centímetro
COX-1	Cicloxygenase-1
COX-2	Cicloxygenase-2
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EHVG	Extrato hidroalcóolico das folhas de <i>Vismia guianensis</i>
EPI	Programa Alargado de Imunização
EROS	Espécies reativas de oxigênio
F4/80	Marcador majoritário de macrófagos
FACS	Citofluorímetro de fluxo
FGF	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H2O2	Peróxido de hidrogênio
IAIE	moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade
IASP	Associação Internacional de Estudos da Dor
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucinas
IP	Intraperitoneal
MPE	Efeito máximo possível
NO	Óxido nítrico
NK	Natural Killer
OMS	Organização mundial da saúde
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PE	Phycoerythrina

PERCP	Proteína clorofilada peridinina
PPD	Derivado Proteico Purificado
RPM	Rotação Por Minuto
TGF- β	Fator de crescimento de transformação beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Mecanismos fisiopatológicos do processo de cicatrização.....	16
1.2. Inflamação induzida por BCG e PPD.....	18
1.3. Propriedades farmacológica de produtos naturais.....	21
1.4. <i>Vismia guianensis</i> : Taxonomia e Características Botânica-geográficas.....	23
1.4.1. Considerações sobre o gênero <i>Vismia</i>	23
1.4.2. Taxonomia de <i>Vismia guianensis</i>	24
1.4.3. Distribuição da espécie <i>Vismia guianensis</i>	24
1.4.4. Características morfológicas de <i>Vismia guianensis</i>	25
1.4.5. Composição química de <i>Vismia guianensis</i>	27
1.4.6. Propriedades farmacológicas de <i>Vismia guianensis</i>	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Material vegetal.....	30
3.2.1. Preparação do extrato hidroalcoólico das folhas <i>V. guianensis</i>	30
3.3. Avaliação <i>in vitro</i> da ação inibitória sobre a alfa-amilase e alfa glicosidase.....	31
3.4. Indução da lesão.....	30
3.5. Obtenção e suspensões celulares.....	31
3.5.1. Peritônio.....	31
3.5.2. Baço.....	32
3.5.3. Sangue.....	32
3.5.4. Linfonodo poplíteo.....	32
3.5.5. Contagem diferencial de células do sangue, baço peritônio e linfonodo poplíteo.....	32
3.6. Avaliação da atividade analgésica por “Tail flick”.....	33
3.7. Modelo de inflamação induzida pelo BCG e PPD.....	33
3.7. Quantificação da produção de mediadores.....	34
3.7.1. Produção de citocinas.....	34
3.8. Imunofenotipagem das células do peritônio e linfonodo poplíteo.....	34
3.9. Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio.....	35
3.10. Análise estatística.....	35

4. RESULTADOS	36
4.1 Efeito anti-diabetes in vitro do EHVG	36
4.2. Avaliação macroscópica das feridas	36
4.3. Avaliação da atividade analgésica	39
4.3.1. Avaliação da contagem total de células na cavidade peritoneal, baço e sangue.....	40
4.3.2. Avaliação da contagem total de células na cavidade peritoneal, baço e sangue.....	41
4.4. Avaliação do efeito da reação inflamatória induzida por BCG	42
4.4.1 Avaliação da contagem total de células do baço e linfonodo poplíteo	43
4.4.2 Avaliação da contagem total e diferencial de células do sangue	44
4.4.3 Avaliação da contagem total e diferencial de células no peritônio e populações de linfócitos T.....	45
4.4.4. Populações de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ no linfonodo poplíteo	46
4.4.5. Populações de macrófagos peritoneais após o tratamento com EHVG.....	47
4.4.6. Produção de peróxido de hidrogênio no Peritônio e citocinas no sangue ...	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mecanismos fisiopatológicos do processo de cicatrização

O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com Diabetes Mellitus (BRASIL, 2001).

Em pacientes diabéticos as lesões nos pés são de ocorrências frequentes, e o processo de reparo tecidual é lento. A maioria das complicações está relacionada aos vasos sanguíneos. Esses vasos podem sofrer alterações e serem danificados devido à alta glicemia, ocorrendo assim danos nos órgãos responsáveis pelo processo de cicatrização, além da baixa síntese de colágeno (MENDONÇA et al., 2009).

Além de dificuldade em cicatrizar as feridas, o diabetes acelera a piora das lesões. Por este motivo, a necessidade de desenvolver drogas que possam atuar no controle da diabetes e ao mesmo tempo estimular a cicatrização de feridas é desejável (MENDONÇA et al., 2009).

As lesões teciduais são lesões que afetam a estrutura e integridade dérmica e a cicatrização é o processo que visa substituir o tecido lesado por um tecido conjuntivo vascularizado. A cicatrização é um processo dinâmico que envolve uma série de eventos celulares e moleculares, incluindo a inflamação, proliferação celular, remodelamento tissular entre outros. Este processo tem como objetivo, reparar e recuperar a área lesionada. (SCHULTZ et al., 2003; CLARK, 2005; HATANAKA; et al., 2007; MEZZANA et al., 2008).

No decorrer do reparo tecidual é observado: coagulação, inflamação, fibroplasia, deposição matricial, angiogênese, epitelização e contração da ferida. Esse processo é caracterizado em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem ou maturação. Essas fases são acompanhadas por diversos eventos interligados, que se sobrepõem continuamente (BALBINO et al., 2005).

A fase inflamatória é caracterizada por se iniciar imediatamente após a lesão, resulta na liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxanas A₂ e prostaglandinas. Nessa fase ocorre formação do tampão de

coagulação, devido à presença das plaquetas que liberam fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanas. Esses mediadores recrutam neutrófilos e macrófagos que serão responsáveis pela liberação de citocinas e quimiocinas e pela remoção das células mortas (BROUGHTON et al., 2006).

Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação às selectinas, produzem radicais livres, auxiliam na remoção dos tecidos lesados de agentes infecciosos e gradativamente, são substituídos por macrófagos. Os macrófagos por sua vez, contribuirão para a remoção do tecido necrosado, na degradação do colágeno e da elastina. A participação dos macrófagos neste processo é caracterizada pela estabilização da ferida atuando na fagocitose de células necrosadas, bem como na degradação de colágeno e elastina. Este processo é de grande importância, pois visa preparar a área lesionada para a fase proliferativa, além de contribuir para o desenvolvimento do tecido de granulação (BROUGHTON et al., 2006; KOH, DIPIETRO, 2018).

Na fase proliferativa ocorre proliferação de fibroblastos no local da ferida, esta fase dura entre o quarto e o décimo quarto dia, ocorrendo epitelização gradual da lesão e regeneração do tecido. A proliferação de fibroblastos no local da lesão, ocorre sob ação de citocinas, resultando no processo de síntese de colágeno ou fibroplasia. A síntese de colágeno é estimulada pela presença de TGF- β e IGF1. (GUO, 2010; JAMES et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2000).

No final da fase de reparo ou remodelamento, os fibroblastos podem diferenciar-se em miofibroblastos e, assim, passam a expressar α -actina e α -miosina, com relevante capacidade para expandir e movimentar-se ao longo da lesão. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização; Este processo ocorre com sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga. Ao final do processo de cicatrização, estas células entram em apoptose. Quando a apoptose não ocorre surgem as várias doenças fibróticas, como por exemplo a cirrose hepática, fibrose renal, fibrose retroperitoneal, queloides entre outras manifestações (BROUGHTON et al., 2006).

O processo cicatricial pode sofrer variações tanto de ordem geral quanto local, influenciando assim, o processo de cura da lesão. Fatores como a idade, estado nutricional, utilização de drogas alterações cardio-circulatórias e na coagulação interferem na cicatrização. Fatores locais tais como: o ambiente contaminado no qual ocorre a ferida, infecção sistêmica concomitante, uso de drogas imunossupressoras e o ressecamento do leito da ferida, tem influência no reparo tecidual (MANDELBAUN et al., 2003).

As feridas provocam dor, devido ao dano tecidual ocasionado. A percepção da dor decorre da integração funcional dos sinais da via da dor. É estimado que a dor crônica esteja presente na metade da população, sendo muitas vezes incapacitante (HASSELSTROM et al., 2002). Esse número é pelo menos duas vezes maior do que o encontrado em relação a dor aguda, que é responsável por cerca de 1/5 das incapacidades moderadas e graves (SAASTAMOINEN et al., 2005).

A dor é também caracterizada fisiologicamente como um sinal de alerta para o organismo, resultando no desencadeamento de reações de defesa e prevenção (KLAUMANN et al., 2008). O processo neurológico responsável pela codificação e processamento do estímulo nocivo é denominado de nocicepção (NAIDU et al., 2015).

A nocicepção está ligada diretamente ao reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, a partir do processamento das informações relacionadas a lesão. (MUIR III, 2009). A nocicepção resulta da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários, denominados de nociceptores, os quais tem a função de transmitir a informação nociceptiva para o cordão espinhal, e posteriormente até ao córtex. (RIEDEL et al., 2001; VERRI et al., 2006).

1.2. Inflamação induzida por BCG e PPD

Albert León Charles Calmette e Jean Marie Camille Guérin no Instituto Pasteur (Paris) entre 1906 e 1919, desenvolveram a vacina BCG, a partir de uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis* original, após 13 anos de passagens

sucessivas em meios de cultura, realizadas a cada três semanas, perfazendo o total de 231 passagens (GRANGE et al., 1983).

A partir de 1921, a vacina produzida com *Mycobacterium bovis* atenuado passou a ser utilizada em humanos, recebendo o nome de BCG (Bacilo *Calmette Guerin*) (STARKE et al., 2004). O BCG utilizado como vacina contra a tuberculose, é administrado na maioria dos bebês do mundo como parte do Programa Alargado de Imunização (EPI) da Organização mundial da saúde (OMS, 2008). Cerca de cem milhões de doses da vacina BCG são aplicadas a cada ano, no mundo e as complicações decorrentes da vacinação são raras (WHO et al., 2014).

O mecanismo de ação do BCG engloba a ativação de linfócitos T e macrófagos ocasionando uma reação inflamatória em duas fases: - a aguda que ocorre logo após a inoculação da vacina e a crônica, que ocorre entre 20 e 40 dias após a vacinação. Há consenso de que o uso do BCG além de induzir uma resposta inflamatória aguda, na região em que foi injetado, em torno de 48 horas após inoculação, também estimula a proliferação e ativação de linfócitos.

Nas reações ao BCG a população de linfócitos T CD4+ é duas vezes maior do que a de linfócitos TCD8+. Alguns linfócitos TCD4+, também conhecidos como T helper (Th) infiltram a epiderme, logo nas primeiras horas após a inoculação. Em 48 horas, são encontrados macrófagos e células de Langerhans, que começam a migrar para fora de epiderme. A avaliação histológica mostra que células de Langerhans e células dendríticas também estão presentes na região do inóculo. Na maioria das vezes, não há infiltrados de basófilos e mastócitos nestas reações (FLYNN et al., 2004; BEISIEGEL et al., 2009). Em recém-nascidos ocorre também aumento de células natural killer ativadas, possivelmente as responsáveis pelo o aumento da eficácia da vacina BCG nessa população (BOYSEN et al. 2009).

As reações ao BCG tendem a se intensificar após o estímulo intradérmico com PPD, promovendo a migração de linfócitos para as regiões perivasculares. Nas primeiras 4 horas após inoculação do PPD é possível observar o influxo de neutrófilos, que vão sendo aos poucos substituídos por macrófagos e células T, nas 10 horas seguintes. O aumento do infiltrado celular termina por romper o feixe de colágeno da derme, por volta das 48 horas após a

inoculação. No momento seguinte é possível detectar linfócitos Th, T citotóxicos (Tc ou CD8+), bem como células de Langherans e células dendríticas (MONAGHAN et al., 1996).

Os macrófagos são as células predominantes no infiltrado inflamatório e podem corresponder 80% das células nesse sítio. Importante ressaltar que esses macrófagos apresentam aumentada expressão de moléculas de MHC de classe II, o que contribui para aumentar a eficiência dessas células na apresentação de antígenos. Assim, embora as células dendríticas também estejam presentes nos locais do inóculo, são os macrófagos as principais células apresentadoras de antígeno nesse tipo de reação (AHMED; BLOSE, 1983; FRAZER et al., 1985; DANNENBERG, 1991).

A ativação das células do sistema imune na área lesada promove a liberação de mediadores liberados por células ativadas, em resposta a um fator etiológico. Entre os principais mediadores da resposta inflamatória incluem-se: - componentes do sistema complemento, componentes do sistema de coagulação ou, ainda, produtos oriundos de células ou tecidos, tais como citocinas, quimiocinas, histamina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetário (PAF) e óxido nítrico (NO) (SPINOSA et al., 2006; MEDZHITOV, 2008).

Os processos inflamatórios caracterizam-se por sinais cardinais descritos como: rubor, edema, calor, dor e perda da função do local afetado. A regulação do processo inflamatório é mediada por diversas vias de sinalização e tipos celulares, incluindo maturação e função das células imunes, bem como a homeostase dos tecidos (MEDZHITOV, 2008).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são caracterizados como uma classe importante de compostos na qual apresentam diversas aplicações terapêuticas. Entretanto, há relato de diversos efeitos adversos, tais como úlceras, falência renal, osteoporose e doenças cardiovasculares associados a fármacos anti-inflamatórios não esteroidais convencionais (MCGETTIGAN e HENRY, 2011; CONAHGAN, 2012).

Os AINEs têm atuação na inibição das enzimas cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2), responsáveis pela produção de prostaglandinas.

As prostaglandinas sintetizadas pela COX-1 são funcionais na proteção tecidual em sítios renais e gastrintestinais, sendo relatados efeitos adversos relacionados a danos nesses tecidos. A COX-2 atua nos locais da inflamação, inibindo a produção de prostaglandinas. (SMITH et al., 2004).

Os fármacos atuais anti-inflamatórios apresentam diversas limitações sobre sua eficácia, efetividade e custo de produção. É necessário o desenvolvimento de anti-inflamatórios que apresentem baixa ou nenhum efeito colateral, é de extrema importância a identificação de novas drogas que promova a resolução da inflamação e que seja eficiente e bem tolerada pelo organismo (CASTRO, 2016).

1.3. Importância de estudos com produtos vegetais

Apesar de o Brasil ter uma grande biodiversidade, vista principalmente na alta diversidade de espécies vegetais, pouco se sabe sobre o potencial farmacológico para o desenvolvimento de medicamentos. No estado do Maranhão a diversidade da flora imprimiu a fitoterapia uma forte tradição popular de uso para tratamentos de enfermidades (LIMA JUNIOR et al., 2006; MELO et al., 2006). Entretanto, somente uma parcela desses vegetais foi avaliada cientificamente quanto ao potencial para a produção de fármacos, extratos vegetais, inseticidas, corantes naturais e derivados, entre outros produtos (TAKAKI; et al., 2007).

A tabela 1 mostra duas espécies botânicas que tem registro na Anvisa, e que podem ser comercializadas para fins terapêuticos, sob prescrição médica.

Tabela 1

Lista de dois fitoterápicos de uso registrado na Anvisa

Nomenclatura botânica	<i>Actaea racemosa</i> L
Nome popular	Cimicífuga
Parte usada	Raiz ou rizoma
Padronização/Marcador	Glicosídeos triterpênicos expressos em 23-epi-26-desoxiacteína
Derivado vegetal	Extratos
Indicações/Ações terapêuticas	Sintomas do climatério
Dose Diária	2 a 7 mg de glicosídeos triterpênicos expressos em 23-epi-26-desoxiacteína
Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sob prescrição médica
Nomenclatura botânica	<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.
Nome popular	Tanaceto
Parte usada	Folhas
Padronização/Marcador	Partenolídeos
Derivado vegetal	Extratos
Indicações/Ações terapêuticas	Profilaxia da enxaqueca
Dose Diária	0,2 a 0,6 mg de partenolídeos
Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sob prescrição médica. Não usar de forma contínuo

*Fonte ANVISA, 2015.

Estima-se que, dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2014 para uso clínico, cerca de 26% era oriundo de produtos naturais ou derivados e 13% apresentavam grupamento farmacológico de origem natural (NEWMAN et al., 2016).

Importa mencionar que, o uso tradicional de plantas nem sempre fornece informações corretas quanto ao modo de preparo e aplicabilidade, em contraste aos produtos industrializados que passaram por estudos clínicos. Dependendo da região onde são utilizadas, as plantas possuem diferentes denominações

populares, favorecendo equívocos quanto à sua correta identificação e com reflexos sobre a possível ação, indicação de uso e dose recomendada. (ARAUJO, 2010).

O uso de plantas medicinais como medicamento requer orientação adequada, para que seu uso não ocasione problemas à fisiologia do organismo. Consequentemente, é importante que seja realizado o controle sanitário destes produtos e a conscientização da população sobre seus riscos, visto que a ideia de que produto de origem natural não faz mal à saúde ainda se encontra amplamente disseminada (CARVALHO, 2007; VASCONCELOS et al., 2010).

1.4 *Vismia guianensis*: Taxonomia e Características Botânica-geográficas

1.4.1 Considerações sobre o gênero *Vismia*

O gênero *Vismia* é constituído de árvores ou arbustos, sendo que 80% das noventa e sete espécies conhecidas apresentam representantes em regiões tropicais e subtropicais, com ocorrência na América do Sul e América Central. As demais espécies desse gênero se distribuem pela África e Ásia. A maioria desses vegetais tem resinas e algumas espécies apresentam ação fitoterápica. (HIRUMA-LIMA et al. 2002).

No gênero *Vismia* já foram isolados diversos metabólitos incluindo as antraquinonas, identificadas como metabólitos típicos desse gênero (MIRAGLIA et al., 1981), triterpenoides, diantraquinonas, benzofenonas e lignanas (NAGEN et al., 1997; GUERRA, 1996), flavonoides, xantonas, antronas, esteroides, monoterpenos (HUSSAIN, 2012).

Algumas espécies tais como: *V. augusta*, *V. confertiflora*, *V. dealbata*, *V. baccifera*; *V. ferrufinea* e *V. guianensis* dentre outras, têm sido utilizadas no tratamento de feridas, ulcerações, afecções de pele, herpes, como febrífugo e purgante (ALVAREZ et al., 2008).

Algumas espécies são produtoras de látex de cor amarelo alaranjado. Este látex é proveniente de cortes feitos no caule da planta e tem sido utilizado por tribos amazônicas no tratamento de feridas, herpes e infecções por fungos na pele (PASQUA et al., 1995).

1.4.2 TAXONOMIA de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy

REINO: Vegetal
DIVISÃO: Angiospermae
SUBDIVISÃO: Spermatophyta
CLASSE: Dicotyledoneae
SUBCLASSE: Archiclamydeae
ORDEM: Guttiferales
SUBORDEM: Theineae
FAMÍLIA: Guttiferae
SUBFAMÍLIA: Hypericoideae
TRIBO: Vismeae
GÊNERO: *Vismia*
ESPÉCIE: *Vismia guianensis*

1.4.3 Distribuição da espécie *Vismia guianensis*

A espécie *Vismia guianensis* é comumente encontrada em países e regiões da América tropical, tais como: Colômbia, Venezuela, Guiana e diferentes áreas do Norte e Nordeste do Brasil (MELO-DE-PINA et al., 2006).

No Brasil as ocorrências confirmadas estão no Norte brasileiro, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins; No Nordeste brasileiro, inclui os estados do Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Sergipe; apresentando distribuição também na região do Centro-Oeste, nos estados de Goiás e Mato Grosso. Sendo um vegetal caracterizado por ocorrências nos domínios fitogeográficos tais como: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, como mostra a figura 2 (BITTRICH et al., 2015).

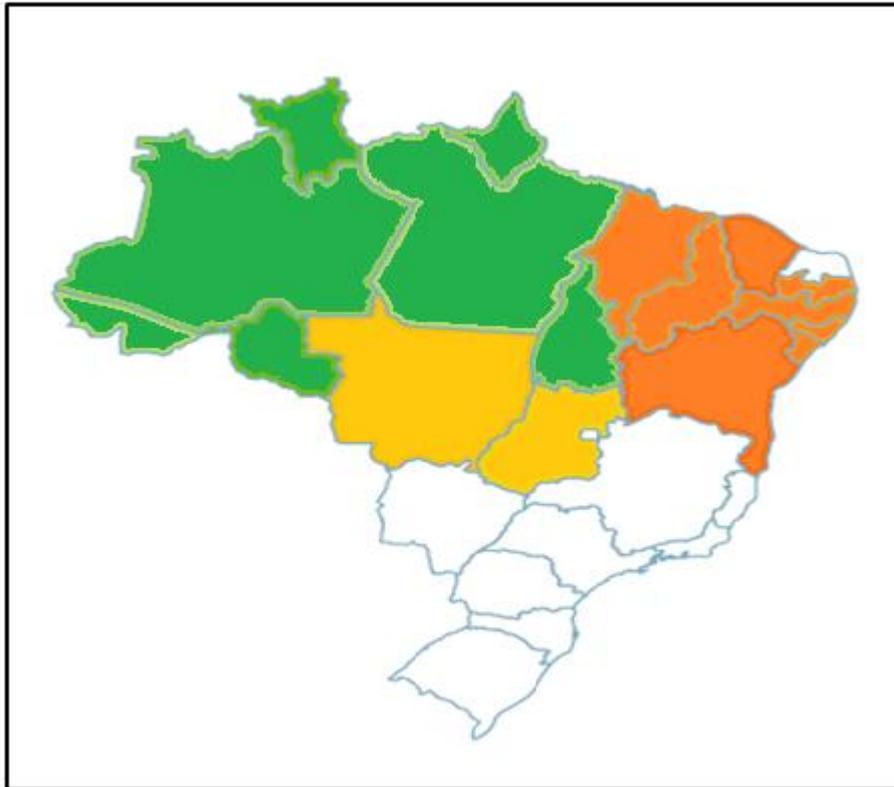


Figura 1. Distribuição da espécie *Vismia guianensis* no Brasil. Coloração do mapa do Brasil em Verde: Região Norte; Laranja: região Nordeste; Amarelo: região Centro-Oeste. Ocorrência da espécie nas três regiões destacadas. Fonte: Flora do Brasil, 2015.

No Maranhão, especialmente em São Luís, essa espécie vegetal é encontrada por quase toda região da ilha. Desempenha importante papel colonizador de áreas desmatadas onde, geralmente, são classificadas entre os primeiros vegetais a crescer (UHL, 1987).

1.4.4 Características morfológicas da espécie *Vismia guianensis*

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy é conhecida popularmente como lacre, árvore da febre, goma-lacre, pau-de-lacre ou lacre-branco. (LORENZI e MATOS, 2002). Esta espécie fornece uma excelente madeira de cor vermelho pálido com veias finas e claras, tecido fibroso, com uma durabilidade regular. Sendo amplamente utilizada na construção civil, marcenaria de luxo e carpintaria (PIO CORRÊA, 1926).



Figura 2. Folhas e tronco de *Vismia guianensis*. Fonte: arquivo pessoal.

V. guianensis é caracterizada como árvore ou arbusto, com altura variando entre 1 e 3 m de altura, ramos cilíndricos, incanos, nós e entrenós bem definidos, com látex ferrugíneo. Apresenta folhas decussadas, face adaxial glabra e abaxial incana, elípticas a ovadas, ápice cuspidado a atenuado, base arredondada a cuneada; pecíolo medindo entre 2 e 2,6 cm e venação broquidódroma (OLIVEIRA et al., 2015).

As flores são inflorescências terminais e axilares em racemo; com pedúnculo medindo entre 2 e 3 cm de comprimento, possui flores andróginas; pedicelo com 3,0 cm comprimento, ausência de brácteas; 5 sépalas coriáceas soldadas na base, 5 pétalas, membranáceas, livres; androceu polistêmone, em vários feixes de estames, adunados na base, não-sinândrio, com 2 mm de comprimento, epipétalos, filetes não-sésseis, conectivo curto; anteras bitecas, abertura longitudinal, sem estaminóides; gineceu com estigma circular, trífido; estilete cilíndrico com 2mm de comprimento, ovário súpero, globoso com 1 mm

de comprimento. Frutos do tipo baga, carnosos, indeiscentes, polispérmicos, ovados, com cerca de 1,7 cm de comprimento e 1 cm diâmetro (OLIVEIRA et al., 2015).



Figura 3. Folhas (A), flores (B), fruto (C) da espécie *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. Fonte: arquivo pessoal.

1.4.5 Composição química de *Vismia guianensis*

Diversos metabólitos secundários já foram identificados nas várias partes de *V. guianensis* incluindo: β -sitosterol, vismiona H (BOTTA et al. 1985), quinonas (GONZALES et al., 1980; DELLE MONACHE et al., 1980), vismioquinonas (GUERRA, 1996), diantronas (POLITI et al. 2004), antraquinonas (GROSSE et al., 1997; POLITI et al., 2004) e xantonas (BILIA et al., 2000). Investigação sobre as sementes de *V. guianensis* resultou na identificação de antraquinonas e triterpenóides (TALA et al., 2013).

1.4.6 Propriedades farmacológicas de *Vismia guianensis*

O uso das plantas medicinais pelas populações nativas e ribeirinhas das regiões norte e nordeste é uma importante fonte de conhecimentos etnofarmacológicos. *Vismia guianensis* está entre as espécies utilizadas nessas regiões, devido as propriedades anti-fúngicas de sua seiva, obtida da casca, e da infusão das folhas, as cascas da árvore são também utilizadas como laxativo, anti-pirético e anti-reumático (LORENZI et al., 2002) e no tratamento de micoses

superficiais da pele (GONÇALVES, 1970). Além disso, as suas folhas são empregadas como tônico (MACFOY et al., 1983).

O extrato aquoso dos frutos de *V. guianensis* tem atividade imunossupressora sobre a produção de anticorpos e moduladora sobre a produção de citocinas (GUERRA; GONÇALVES, 1991; GUERRA, 1996); ação hipotensora (GOMES, 1992), atividade antimicrobiana (GUERRA et al., 1993), antibacteriana e antioxidante (SILVESTRE et al., 2012) ação antitumoral para células de adenocarcinoma de cólon (ALVAREZ et al., 2008) e atividade anti-inflamatória e antifúngica (OLIVEIRA, et al., 2017) e ação anti-malária (MENAN et al., 2006). As sementes são usadas como alimento em sopas e caldos (MBAVENG et al., 2008).

A relevância do estudo experimental com as folhas da *Vismia guianensis* (Aubl.) deve ser considerada por trata-se de uma planta facilmente encontrada no país, e que, o seu manuseio na manipulação farmacêutica, pode tornar seu custo acessível à população. Assim, frente as potencialidades que esta espécie apresenta, serão investigados os efeitos em modelos anti-diabetes, cicatrizante, analgésico e inflamatório, visando contribuir para o desenvolvimento de novas formulações, podendo competir com os fármacos já disponíveis no mercado, ou ser usado concomitantemente para melhor eficácia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade anti-diabetes, cicatrizante, anti-inflamatória e analgésica do extrato das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos do extrato na inibição das enzimas alfa-amilase e alfa glicosidase;
- Investigar o efeito de *V. guianensis* (Aubl.) Choisy na cicatrização de feridas cutâneas;
- Avaliar o efeito analgésico de *V. guianensis* (Aubl.) Choisy
- Avaliar os efeitos de *V. guianensis* (Aubl.) Choisy na resposta inflamatória, considerando a celularidade e a produção de mediadores.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Animais:

Foram utilizados 35 camundongos Swiss fêmeas (n=5/grupo), com 2-3 meses e pesando em média 25g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos a temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 44-56%, sob ciclos normais de claro e noite de 12 horas, com livre acesso a ração esterilizada e água acidificada. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Maranhão. CEUA-UFMA – processo nº 23115.009717/2015-10.

3.2 Material vegetal

As folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy foram coletadas no município de São Luís- MA e os exemplares foram identificados e depositados no Herbário da Universidade Federal do Maranhão, após confecção da exsicata e registro. Número registro 11.078 – Herbário do Maranhão – MAR.

3.2.1 Preparação do extrato hidroalcolólico das folhas *V. guianensis* (EHVG):

Para obtenção do extrato, as folhas foram secas em temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), a 37°C , durante sete dias. O material seco foi triturado em moinho elétrico (TENAL TE 340). A obtenção do extrato ocorreu após maceração em etanol 70% (MERCK), por três semanas, com troca semanal do solvente. Em seguida, o EHVG foi concentrado sob pressão reduzida, liofilizado e estocado em frascos estéreis a 4°C , até a realização dos ensaios. Para uso o extrato liofilizado foi pesado e diluído em PBS (50g/mL) (GUERRA, 1996).

3.3 Avaliação *in vitro* da ação inibitória sobre a alfa-amilase e alfa glicosidase:

Nessa avaliação foram utilizadas três concentrações do extrato bruto das folhas e três do extrato bruto dos frutos de *V. guianensis* para avaliar a atividade sobre a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase. O ensaio consistiu resumidamente em incubar diferentes concentrações do extrato com as enzimas e avaliar em leitor de ELISA a capacidade de inibição. A arcabose nas concentrações de 0,5; 5 e 50mg foi usada como controle positivo.

3.4 Indução de ferida para avaliar o efeito do EHVg na cicatrização

Os animais foram anestesiados [cloridrato de xilazina (20mg/Kg) e cloridrato de ketamina (25mg/Kg), via intraperitoneal. Após a anestesia, o dorso foi limpo com álcool 70% e depilado. Para indução da lesão foi utilizado um molde circular, com 1cm de diâmetro e a pele foi removida com auxílio de pinça e tesoura estéreis. A hemostasia ocorreu por pressão com gaze embebida em solução salina estéril, durante 1 a 2 minutos. Os animais foram mantidos aquecidos e hidratados até o fim do efeito da anestesia. Nesse experimento foram utilizados 10 animais, distribuídos em 2 grupos, sendo grupo controle, que recebeu salina e o grupo *Vismia*, tratado com o EBVG (5mg/Kg), via oral, por 15 dias.

A evolução do processo cicatricial foi acompanhada a cada dois dias, até o 16 dia. Nesses intervalos as lesões foram mensuradas, com auxílio de paquímetro digital e fotografadas, utilizando-se câmera fotográfica digital, acoplada a um tripé, com distância padronizada de 15cm até o total da lesão. Em cada dia, foram tomadas duas medidas da lesão, uma vertical e outra horizontal, sendo feita a média dessas medidas para calcular a área das lesões utilizando a fórmula de área da circunferência (πr^2).

3.5 Obtenção e suspensões celulares:

As células do sangue, baço, peritônio e linfonodo poplíteo foram obtidas conforme descrito a seguir e depois foram fixadas e coradas com solução de

cristal violeta (0,05% em ácido acético 30%), na proporção 1:9. As células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.5.1 Células do Peritônio

Para obtenção das células peritoneais, a cavidade peritoneal foi lavada com 5mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e as suspensões celulares foram colhidas com auxílio de seringa, mantidas em tubos de polipropileno com fundo cônico (Costar), centrifugadas e diluídas para a contagem celular. Essas células foram utilizadas para avaliar diferentes populações celulares por microscopia e por citometria de fluxo, dependendo do ensaio.

3.5.2 Células de Baço

O baço foi removido assepticamente triturado em tamiz e as suspensões celulares obtidas foram centrifugadas à 1500 rpm, ressuspensas em PBS, diluídas e coradas com solução de Turk para contagem. Essas células foram utilizadas para avaliar diferentes populações celulares por microscopia, dependendo do ensaio.

3.5.3 Sangue

As amostras individuais de sangue foram obtidas por punção do plexo retroorbital. Para a determinação do número total de leucócitos, as amostras de sangue foram centrifugadas e coradas com solução de Turk, para a contagem das células ao microscópio óptico, usando a câmara de Neubauer. Essas células foram utilizadas para avaliar diferentes populações celulares por microscopia.

3.5.4 Linfonodo poplíteo:

O linfonodo poplíteo foi removido, assepticamente, triturado em tamiz e as células obtidas foram centrifugadas, ressuspensas e diluídas em PBS. Para contagem total as células foram coradas com cristal violeta, conforme 3.4.1. Essas células foram utilizadas para avaliar diferentes populações celulares por microscopia e por citometria de fluxo, nos ensaios de avaliação do efeito anti-inflamatório.

3.5.5 Contagem diferencial de células do sangue, baço peritônio e linfonodo poplíteo

A contagem diferencial foi avaliada em microscópio de luz comum, com auxílio da objetiva de 100, a partir da contagem de 100 células. Os dados referentes a cada uma das diferentes populações foram expressos em porcentagem.

3.6 Avaliação da atividade analgésica por “Tail flick”

Nesse ensaio foram utilizados 15 camundongos (n=5/grupo), divididos em três grupos como a seguir: Controle: recebeu PBS (5mg/kg) via oral. Morfina: recebeu morfina (10 mg/Kg) via intraperitoneal e EBVG: recebeu o extrato hidroalcoólico de *Vismia guianensis* (5mg/Kg), via oral.

Para a avaliação da atividade analgésica do extrato hidroalcoólico de *Vismia guianensis* foi utilizado o teste radiante de calor radial, para a avaliação do efeito analgésico os camundongos foram submetidos ao estresse térmico na cauda e a mudança de sensibilidade foi analisada por um Analgesiômetro (Techno Type: Mark-IB, SL. No; 720,121), com intensidade da corrente constante. A distância entre a fonte de calor e a pele da cauda foi de 1,5 cm e o tempo de corte foi ajustado em 10 s. O tempo gasto pelos camundongos para retirar (agitar) a cauda foi considerada como o tempo de reação (D'Amour; Smith, 1941; D'Amour; Smith 2013). As observações foram feitas antes do tratamento e nos intervalos de 30, 60, e 120 min depois. A atividade anti-noceção foi

quantificada como o efeito máximo possível (MPE) usando a fórmula posposta por (TORRES et al., 2001).

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

3.7 Modelo de inflamação induzida pelo BCG e PPD

Para o modelo experimental de inflamação foram utilizados 10 animais, distribuídos em 2 grupos, um controle não tratado e o grupo *Vismia*, tratado com o EHVG (5mg/Kg), via oral, por 34 dias após o inóculo de BCG (*Bacilo Calmette-Guérin*), 100mg/mL, com 10⁸ bacilos/mL (Instituto Butantã, São Paulo, Brasil) foi inoculada no espaço subcutâneo do coxim plantar, da pata posterior esquerda, na quantidade de 10µL (10⁵ bacilos). Ao final de 22 dias os animais foram desafiados com 10 µL de PPD (Derivado Proteico Purificado). As mediadas do tamanho das patas foram realizadas a cada 24 horas, até o 3º dia, e depois de 3 em 3 dias, até o 34º dia, com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo).

3.8 Quantificação da produção de mediadores:

3.8.1 Produção de citocinas

A concentração de citocinas foi avaliada no soro dos animais inoculados com BCG, utilizando o kit Th1/Th2/Th17 usando a técnica de microesferas (*beads*) CBA (Cytometric Bead Array), de acordo com informações do fabricante (BD Biosciences). O ensaio consistiu resumidamente em incubar 25µL de amostra com 25µL da mistura de beads e 25µL do reagente de detecção. Os tubos foram homogeneizados e incubados por duas horas. Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo com FACScalibur (BD Biosciences) e após a leitura, os dados foram analisados com auxílio do software Flow Jow®. Os valores foram expressos em pg/mL para cada uma das citocinas, a partir das curvas padrão.

3.9 Imunofenotipagem das células do peritônio e linfonodo poplíteo

Após contagem as células peritoneais e do linfonodo poplíteo foram ajustadas para a concentração de 10^5 células/mL e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em “U”, marcadas com os anticorpos específicos (Tabela 2) e incubadas a 4°C por 15 minutos. Foram montados 3 painéis de marcação para cada órgão, e utilizados os seguintes marcadores de ativação: CD28 (PE) CD86 (Percp); CD69 (PE) e anti-IaIe (PE).

Tabela 2. Painel de marcação para células peritoneais e do linfonodo poplíteo

Fluocromo/ Células alvo	FITC	PERCP	PE
Linfócitos T auxiliares	CD3+	CD4+	CD28
Linfócitos T citotóxicos	CD3+	CD8+	CD28
Macrófagos	F4/80	CD86	IaIe

3.10 Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada a partir da dihidrorrodamina 123 (DHR) (Sigma Aldrich), para verificar a oxidação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos estimulados ou não com acetato de forbol miristato (PMA). O ensaio consistiu resumidamente em incubar macrófagos peritoneais com 3,75mg/mL ou PMA + DHR. As amostras foram incubadas a 37°C, 10min, e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (Guava® easyCyte) segundo CHEN; JUNGER, (2012).

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos com a média \pm desvio padrão da média (SD) de 5 animais por grupo. A análise estatística é feita por análise de variância na avaliação de vários grupos, ou teste de T de student, na comparação entre os controles e os grupos experimentais, sendo considerado o nível de significância $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 O EHVG apresenta ação anti-diabetes

A Tabela 3 mostra que o EHVG inibiu as enzimas α -amilase e α -glicosidase, com eficácia semelhante a arcabose, usada como padrão positivo

Tabela 3. Efeito do extrato das folhas de *Vismia guianensis* na inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase

Substância/ Enzimas	Extrato das folhas de <i>V.guianensis</i>			Arcabose
	0,5mg	5mg	50mg	
α -glicosidase	64 \pm 0,04	61 \pm 0,09	79 \pm 0,70	99 \pm 0,05
α -amilase	57 \pm 0,60	66 \pm 0,22	71 \pm 4,22	90 2,09

4.2 Avaliação macroscópica das feridas:

Para que fosse caracterizado os efeitos do EHVG no processo de reparo tecidual, foi avaliada a regressão das feridas pela ação do extrato. As fotografias na figura 4A mostram a evolução do processo cicatricial no grupo tratado com EHVG e no grupo controle. A figura 4B, mostra a variação nas medidas ao longo do tempo.

Após a excisão na pele não foi observada hemorragia em nenhuma das feridas, ao longo de todo o período de observação. No 2º dia, animais dos dois grupos apresentavam lesões avermelhadas, com formação parcial de crosta e ausência de secreção.

No 4º dia, os dois grupos apresentavam formação parcial da crosta, mas as feridas ainda apresentavam aspecto avermelhado, entretanto, já era perceptível a retração da ferida. No 6º dia, animais do grupo EHVG apresentaram lesões menores, com formação de crostas secas, mais densas e escuras do que o controle. Este apresentava lesões com crostas ainda em formação.

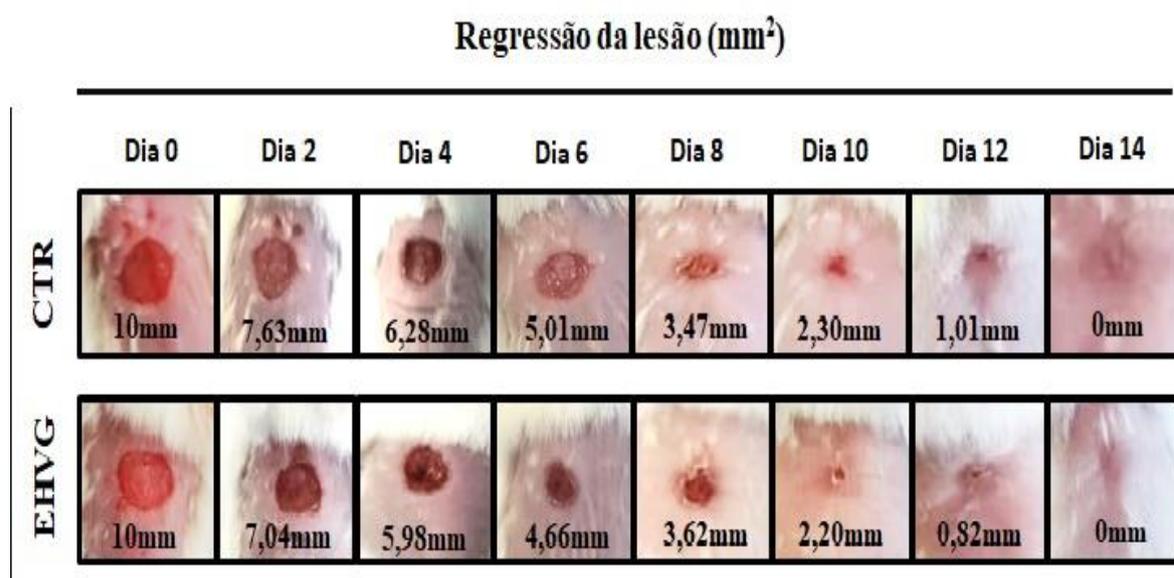
Entre o 8º e 10º dia, os animais dos dois grupos apresentavam evolução semelhante, com formação de tecido com coloração rosa claro, contornando as bordas da ferida. No 12º dia, dois animais do grupo tratado já apresentavam re-epitelização total, enquanto nos demais animais e no grupo controle as feridas,

apesar de bem reduzidas, ainda não tinham concluído o processo de re-epitelização, embora já estivesse bem avançado.

No 14º dia, três animais de cada grupo apresentavam cicatrização total da ferida e no 16º dia todos os animais dos dois grupos apresentaram feridas fechadas e a área depilada já totalmente coberta por pelos.

A Figura 4B se refere aos efeitos do EHVG na evolução da área da lesão. No 2º dia após a indução da lesão, os animais tratados com o EHVG apresentaram menor redução da ferida (69%) do que o controle (48%). Mesmo o EHVG não tendo uma ação aceleradora significativa na cicatrização, foi possível observar que o tratamento com EHVG, estimulou a contração da ferida de forma mais efetiva do que o observado no grupo controle a partir do 10º dia (Figura 1B).

4A



4B

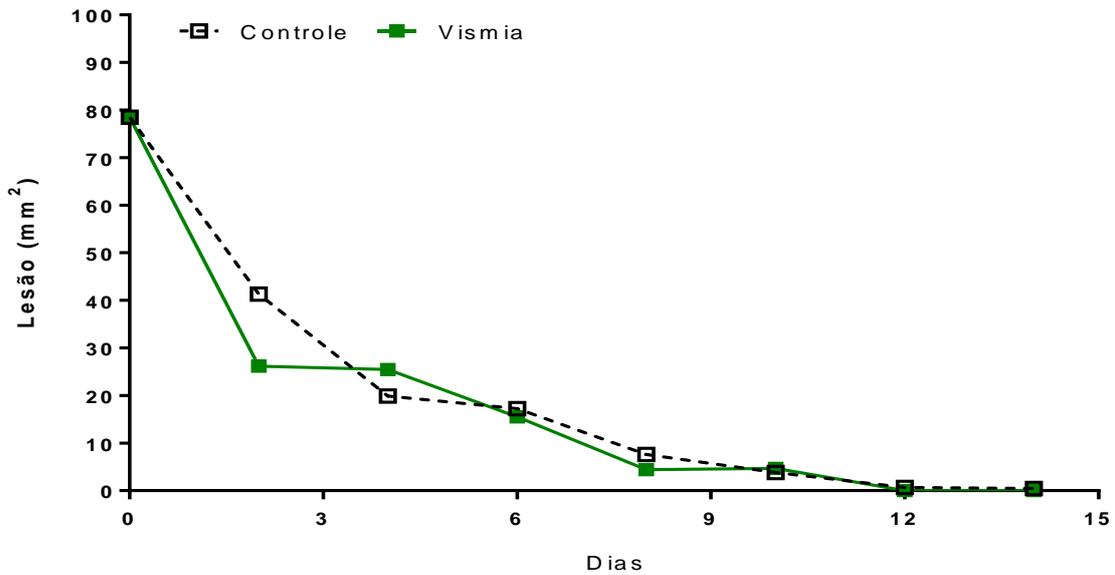


Figura 4. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Vismia guianensis* (EHVG), na evolução da cicatrização de ferida cutânea a partir de Fotografias (A) e medidas da lesão (B) em camundongos Swiss tratados com 5mg/Kg de EHVG, via oral, diariamente, durante 14 dias (Grupo Vismia), foram comparados ao grupo Controle: recebeu, nos mesmos intervalos, somente água. Os resultados se referem a média das medidas de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.3 O EHVG apresenta atividade anti-nociceptiva

Na Figura 5 é possível observar que a morfina, usada como controle positivo, apresentou atividade anti-nociceptiva e proteção máxima em todos os intervalos, correspondendo um percentual de latência de 9% no momento 0; 43% aos 30 minutos; 73% aos 60 minutos e 70% aos 120 minutos.

O tratamento com EHVG resultou em percentuais de latência que variaram de 6% no tempo inicial, 17%, após 30 minutos até 42% e 43%, aos 60 e 120 minutos, respectivamente, atingindo o seu potencial máximo aos 60 minutos. Aos 30 minutos o maior percentual de latência foi observado no grupo Morfina e os dados do grupo *Vismia* foram semelhantes ao grupo PBS, nos intervalos seguintes (60 e 120 min) ação do EHVG foi semelhante à da morfina e maior do que a observado no grupo PBS.

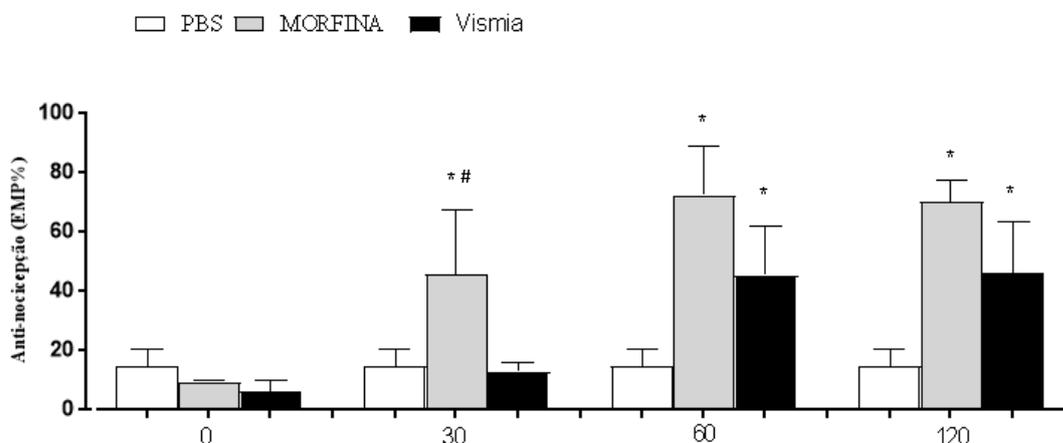


Figura 5. Efeito anti-nociceptivo do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis*. Camungongos Swiss, fêmeas, foram divididos em três grupos tratados no momento 0 conforme o grupo: - Vismia: recebeu extrato das folhas *Vismia guianensis* (5mg/Kg), via oral; - PBS: recebeu somente água e - Morfina: recebeu 10mg/Kg de morfina, via ip. Os animais foram sacrificados no 15º dia, quando foram obtidas as células. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle (#) em comparação ao grupo Vismia. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.3.1 O tratamento com EHVG aumenta o número de leucócitos no sangue e no baço.

O tratamento com EHVG aumentou o número de leucócitos no sangue (Figura 6A), o número de células no baço (Figura 6B), mas não afetou o número de células peritoneais, como mostra a Figura 6C.

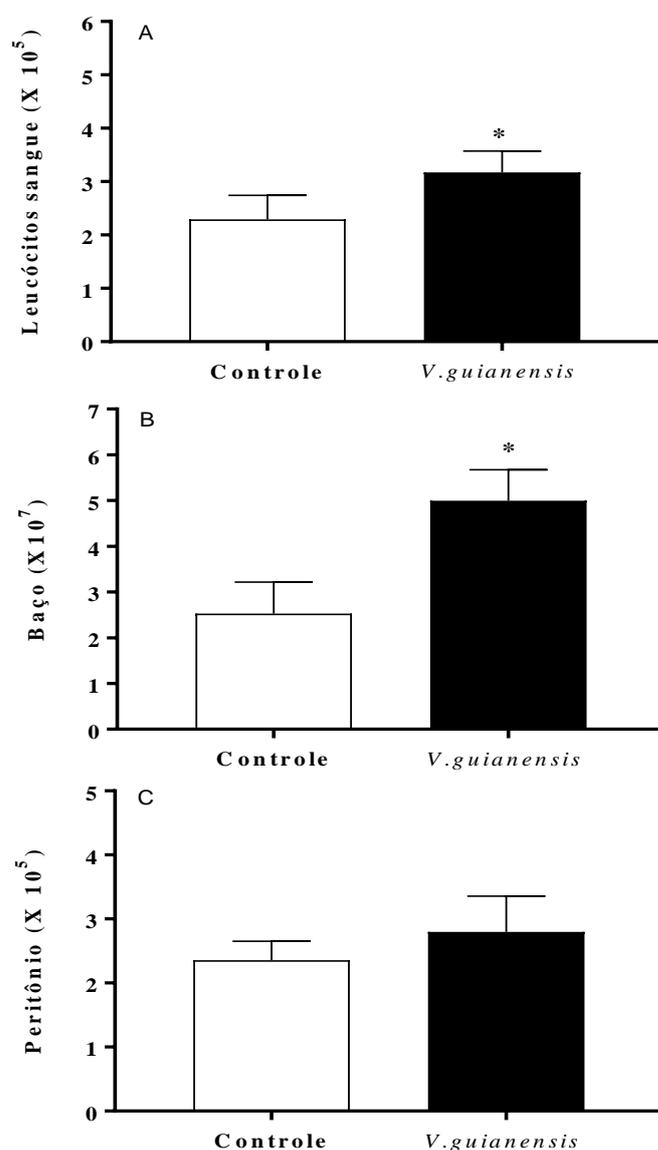


Figura 6. Contagem total de células no sangue (A), no baço (B) e no peritônio (C). Camundongos Swiss, fêmeas foram utilizados para indução de lesão cutânea no dorso para avaliar a cicatrização. Os animais foram divididos nos grupos: - *V. guianensis*: tratado com extrato das folhas *Vismia guianensis* (EHVG- 5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 14 dias; - Controle: recebeu, somente água. As células foram obtidas no 15º dia. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.3.2 O tratamento com EHVG afeta a celularidade do baço

A avaliação da contagem diferencial mostrou que o tratamento com EHVG, não alterou a contagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos no sangue (Figura 7A) nem afetou o número de linfócitos, neutrófilos, macrófagos basófilos no peritônio (Figura 7C). Entretanto no baço o tratamento com EHVG reduziu o número de neutrófilos e aumentou o número de linfócitos e macrófagos (Figura 7B).

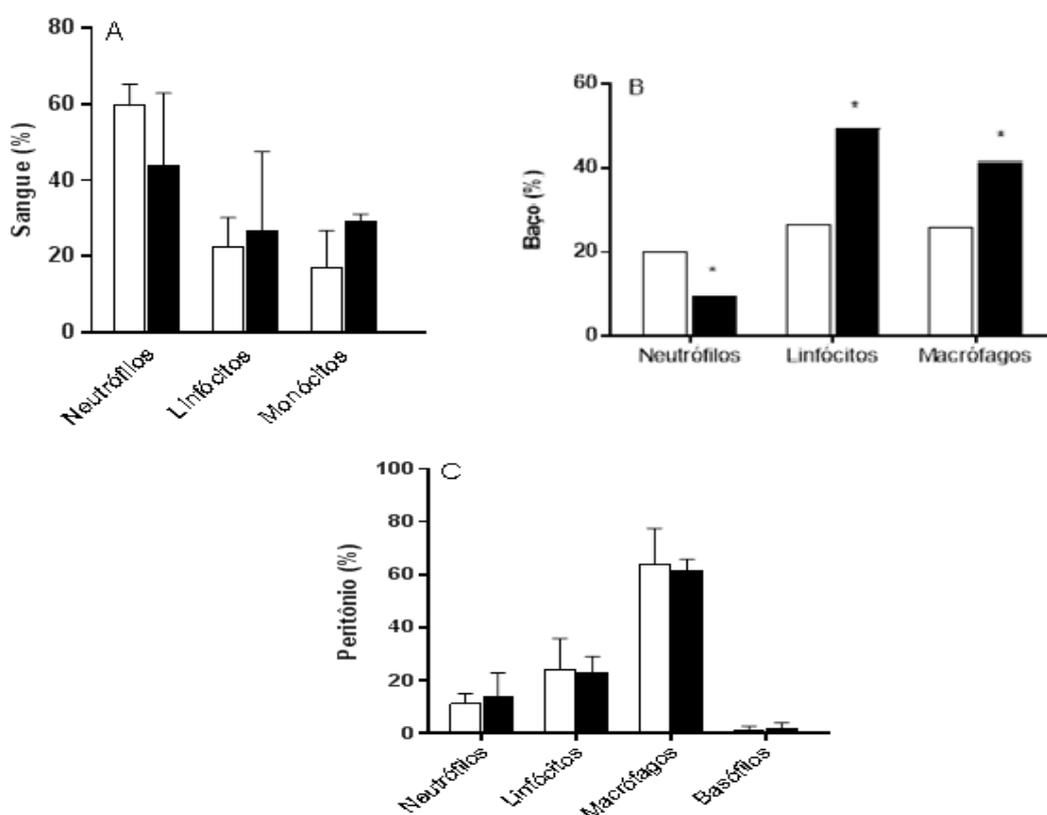


Figura 7. Contagem diferencial de células no sangue (A), baço (B) e peritônio (C) de camundongos Swiss nos quais foi induzida uma lesão no dorso para avaliar a cicatrização. Os animais foram divididos em dois grupos: - grupo Vismia: tratado com extrato das folhas *Vismia guianensis* (EHVG - 5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 14 dias; grupo Controle: recebeu, nos mesmos intervalos, somente água. As células foram obtidas 15º dia. Os resultados correspondem a média ± desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) p<0,05 na comparação com o controle. Utilizado o teste de T de student para estatística.

4.4 Efeito anti-inflamatório do EHVG na reação induzida por BCG/PPD

A Figura 8 mostra que o EHVG reduziu drasticamente o edema de pata nas primeiras 48 horas e também entre os dias 18 e 20. Na segunda fase da resposta inflamatória, decorrente do desafio com PPD, o EHVG novamente reduziu a inflamação, com maior efeito entre o 24 e 28º dia.

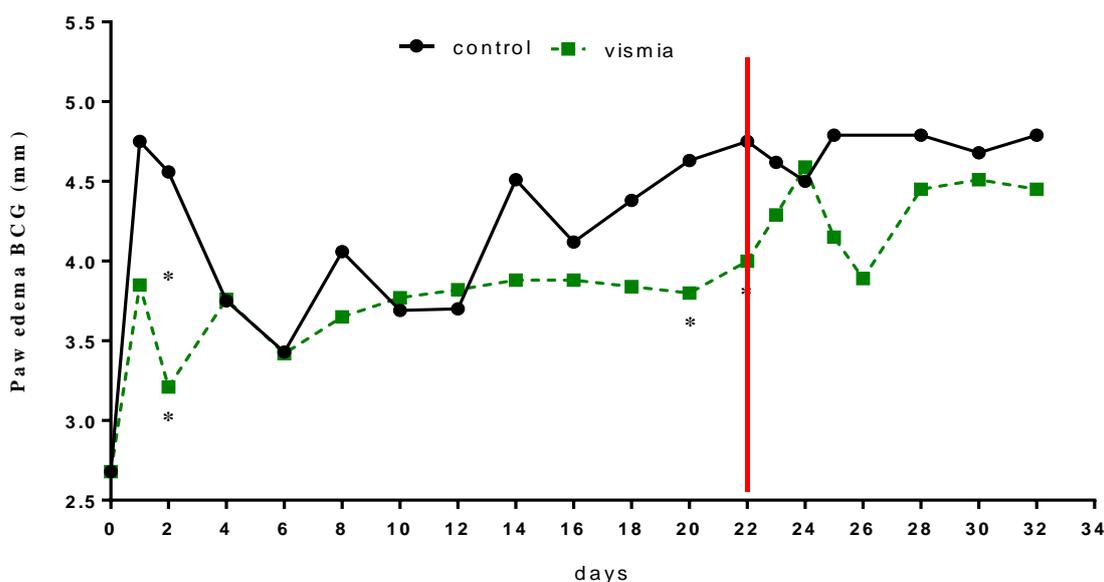


Figura 8. Efeito anti-inflamatório do EHVG sobre o edema de pata induzido por BCG. de camundongos Swiss, fêmeas, nos quais foi induzida reação inflamatória a partir no inóculo de BCG no coxim plantar. Os animais foram divididos em dois grupos: - grupo Vismia: tratado com extrato das folhas *Vismia guianensis* (EHVG - 5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 35 dias; grupo Controle: recebeu, nos mesmos intervalos, somente água. Os animais foram desafiados com PPD no 21º dia e mortos no 35º dia. As medidas das patas foram aferidas a cada 2 dias com auxílio de paquímetro digital. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de *T* de sturent para estatística.

4.4.1 Avaliação da contagem total de células do linfonodo poplíteo e baço

O tratamento com EHVG aumentou o número de leucócitos no linfonodo poplíteo (Figura 9A), mas não afetou o número de células do baço (Figura 9B).

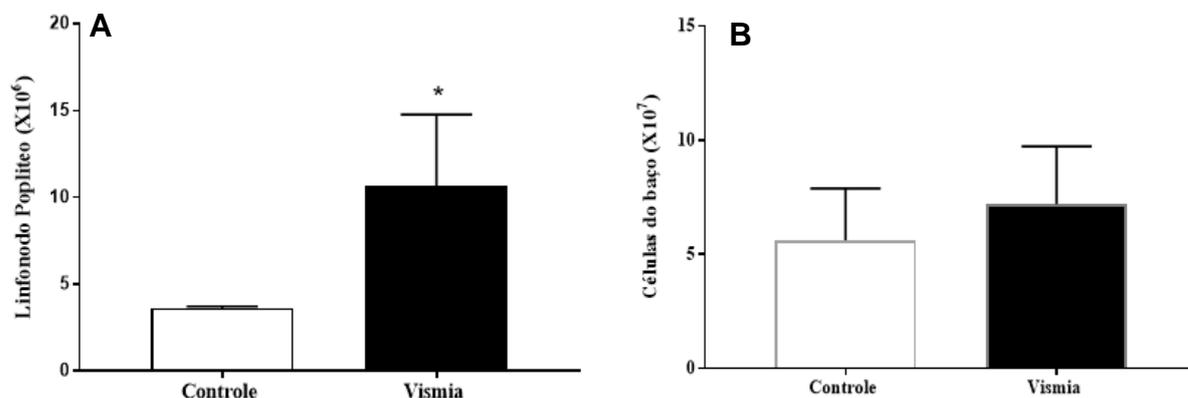


Figura 9. Número total de células no linfonodo poplíteo (A) e no baço (B) de camundongos Swiss nos quais foi induzido edema de pata por BCG. Os animais foram divididos em dois grupos: - grupo Vismia: tratado com extrato de *Vismia guianensis* (EHVG-5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias; grupo Controle: recebeu, nos mesmos intervalos, somente água. Os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia e mortos no 35^o dia, quando foram obtidas as células. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.4.2 O tratamento com EVGH aumentou várias populações celulares no sangue

O tratamento com o EHVG aumentou o número de leucócitos no sangue, devido ao aumento na população de neutrófilos e monócitos. Entretanto não afetou os números de linfócitos (Figura 10).

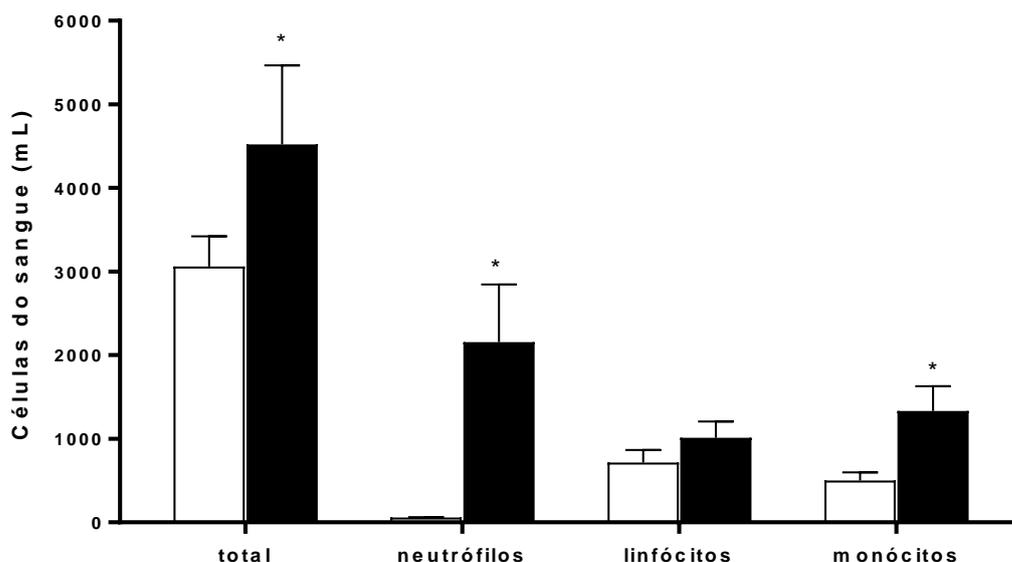


Figura 10. Aumento de células no sangue de camundongos Swiss nos quais foi induzido edema de pata por BCG. Os animais foram divididos em dois grupos: - grupo Vismia: tratado com extrato de *Vismia guianensis* (EHVG □ -5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias; grupo Controle (□): recebeu, nos mesmos intervalos, somente água. Os animais foram desafiados com PPD no 21º dia e mortos no 35º dia, quando foram obtidas as células. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.4.3 O EHVG aumentou a migração de linfócitos T auxiliares para o peritônio

A Figura 11A mostra que o tratamento com EHVG aumentou o número de linfócitos no peritônio, mas não afetou as populações de neutrófilos, macrófagos e mastócitos.

A identificação das populações de linfócitos T, que migraram para o peritônio, mostrou que tratamento com EHVG, aumentou o número de linfócitos TCD4⁺ (Figura 11B), mas não afetou a população de linfócitos TCD8⁺ (Figura 11C).

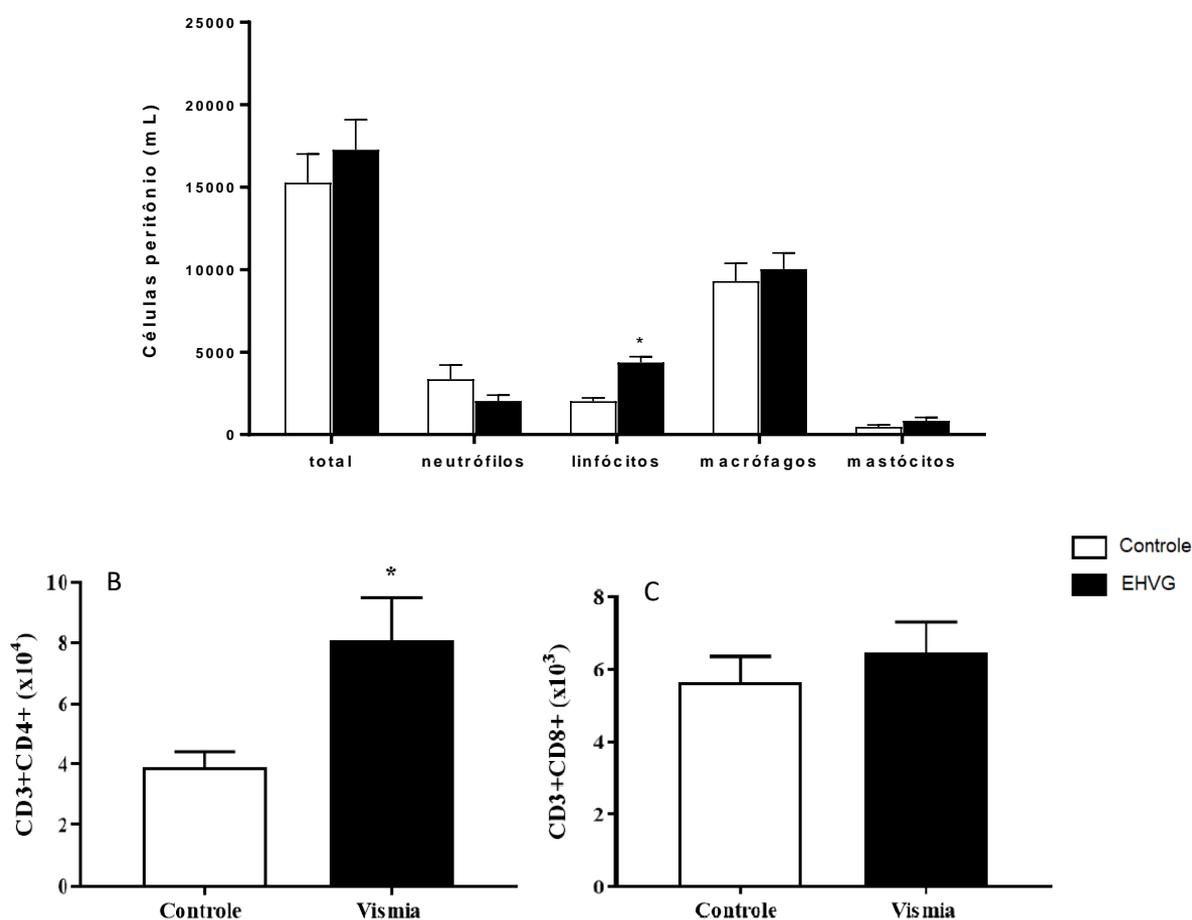


Figura 11. Contagem total, diferencial de células e populações de linfócitos T no peritônio de camundongos Swiss com edema de pata por BCG. Foram avaliados dois grupos: - EHVG: tratado com extrato de *Vismia guianensis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias; - Controle: recebeu água. Os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia e mortos no 35^o dia, quando foram obtidas as células. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de T de student para estatística.

4.4.4 O tratamento com EHVG aumenta a presença de linfócitos no linfonodo poplíteo

A Figura 12 mostra que o tratamento com EHVG aumentou número de total de células, bem como o de linfócitos T auxiliares e citotóxico no linfonodo poplíteo.

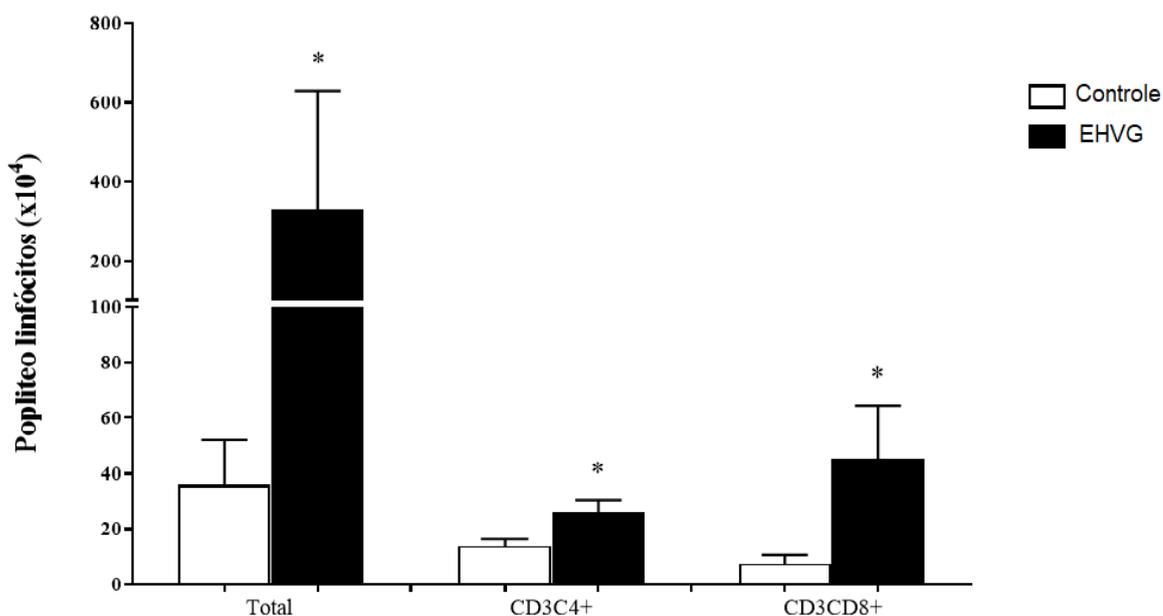


Figura 12. O tratamento com EHVG aumenta o número total de células e de linfócitos TCD4+ no poplíteo de camundongos Swiss com edema de pata por BCG. Foram avaliados dois grupos: - EHVG: tratado com extrato de *Vismia guianensis* (5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias; - Controle: recebeu água. Os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia e mortos no 35^o dia, quando foram obtidas as células. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.4.5 O tratamento com EHVG não afeta a população de macrófagos peritoneais

A Figura 13 mostra que o EHVG não teve efeito sobre a população de macrófagos totais, em repouso ou ativados no peritônio.

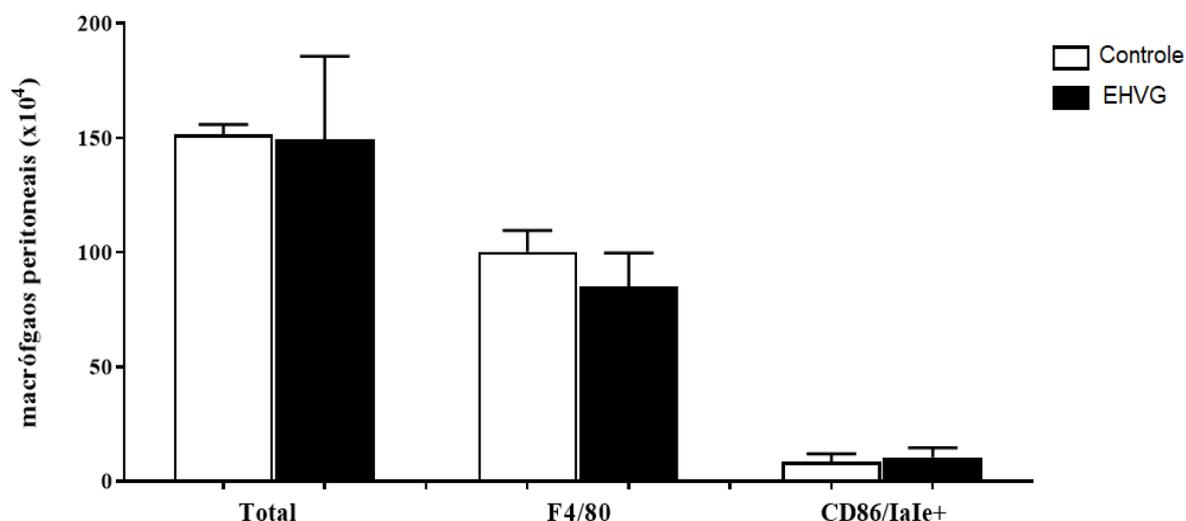


Figura 13. O tratamento com EHVG não afeta a população de macrófagos peritoneais, ativados ou não, de camundongos Swiss com edema de pata por BCG. Foram avaliados dois grupos: - EHVG: tratado com extrato de *Vismia guianensis* (-5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias; - Controle: recebeu água. Os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia e mortos no 35^o dia, quando foram obtidas as células. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. Utilizado o teste de *T* de student para estatística.

4.4.6 O tratamento com EHVG não afetou a produção de peróxido de hidrogênio no peritônio nem a de citocinas no sangue.

A Figura 14A mostra que a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio não foi afetada pelo tratamento com EHVG, mesmo após estimulado com PMA. Também não foram alteradas as concentrações de IL-17 (Figura 14B); IL-6 (Figura 14C) e TNF- α . Além disso, foram indetectáveis as concentrações de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2 (dados não apresentados).

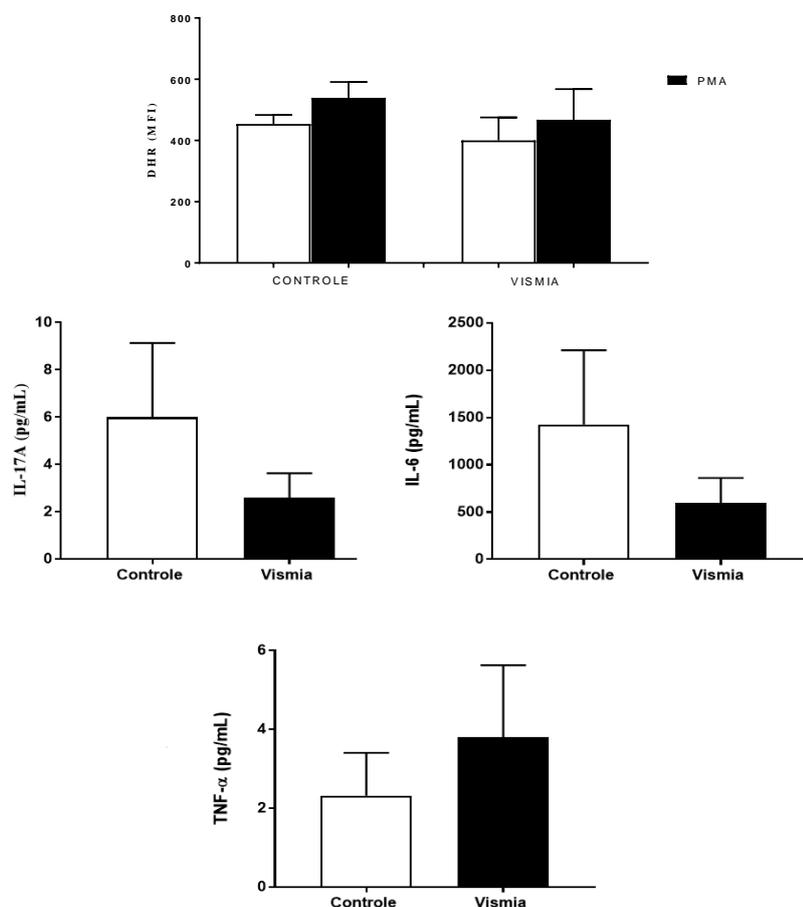


Figura 14. Efeito do tratamento com EHVG sobre a produção de peróxido de hidrogênio (A); IL-17 (B); IL-6 (C) E TNF- α (D) de camundongos Swiss com edema de pata por BCG. Foram avaliados dois grupos: - Vismia: tratado com extrato de *Vismia guianensis* (EHVG - 5mg/Kg), por via oral, diariamente, durante 34 dias; - Controle: recebeu água. Os animais foram desafiados com PPD no 21^o dia e mortos no 35^o dia, quando foram obtidas as células. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. Utilizado o teste de T de student para estatística.

5. DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as plantas com propriedades fitoterápicas são a melhor fonte para descoberta de novas drogas. Entretanto, ainda hoje, apesar do grande volume de evidências científicas, os fitoterápicos ainda não têm uma ampla utilização, infelizmente os medicamentos tradicionais com base em produtos vegetais permanecem empíricos, as doses, as durações de tratamento ou as interações com outros medicamentos não estão claramente definidas. Portanto, existem necessidades urgentes para estudos químicos e farmacológicos que podem ajudar a alcançar a padronização desse tratamento (UMA et al., 2016).

A espécie *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy vem sendo apontada como espécie vegetal promissora devido ao seu potencial farmacológico. Segundo Seo et al. (2000), as benzofenonas e as benzocumarinas isoladas de *V. guianensis* apresentaram ação antitumoral devido a citotoxicidade contra as células de carcinoma epidermóide oral. A atividade antitumoral foi também detectada por Suffredini et al. (2007) mostrando uma acentuada ação letal dos extratos orgânicos e aquosos de *V. guianensis* frente a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humana.

Os extratos da raiz e da casca de *V. guianensis* apresentaram atividade antimicrobiana frente aos seguintes micro-organismos: *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (SANTOS et al., 2007). Atividade também detectada por Oliveira, (2009) que adicionalmente mostrou efeito anti-inflamatório, devido a ação de extratos de *V. guianensis* na redução da produção de óxido nítrico em testes clínicos.

Segundo Politi et al. (2004), nas folhas de *Vismia guianensis* existem majoritariamente quatro classes de metabólitos secundários como componentes principais: antraquinonas, flavonoides, xantonas e benzofenonas, sendo que o maior número de compostos identificados, pertencem a classe das antraquinonas, cujo esqueleto base é a emodina: 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona.

Ao que se sabe, este é a primeira vez que a atividade anti-diabetes, cicatrizante, ação analgésica e anti-inflamatória é avaliada por *Tail flick* utilizando o extrato das folhas de *Vismia guianensis* (EHVG).

Os resultados mostraram que EHVG apresenta potencial efeito anti-diabetes, pois inibiu as duas enzimas α -amilase e α -glicosidase, independente da dose testada, com resultados muito próximos da arcabose utilizada no estudo como controle positivo. Entretanto, após várias tentativas frustradas de adquirirmos animais diabéticos não obesos, ou de induzir a diabetes com estreptozotocina, não conseguimos testar essa atividade *in vivo*.

Considerando que pacientes diabéticos apresentam problemas em cicatrização e por isso podem também sentir muitas dores, investigamos os efeitos do EHVG no processo de cicatrização de feridas cutâneas e o seu efeito analgésico.

Os resultados mostraram que o EHVG não foi tóxico quando administrado por via oral, pois além dos animais permanecerem vivos e em boas condições, as contagens celulares do sangue e baço foram maiores nos animais tratados com o extrato. Esses dados corroboram com os achados de Guerra (1996), que ao avaliarem a citotoxicidade do extrato bruto dos frutos de *Vismia*, mostraram que o tratamento oral, contínuo por 30 dias, não modificou o peso dos animais e não alterou o peso do baço ou a celularidade esplênica. Também Borges et al. (1994), concluíram que o extrato não apresentava citotoxicidade e nem induzia mutações visíveis em eritrócitos jovens obtidos da medula.

Investigamos se o EHVG teria efeito no processo de cicatrização, utilizando o modelo experimental de ferida aberta na região dorso-costal. Observamos que o tratamento com o extrato resultou em reação inflamatória menos intensa, mas não reduziu o tempo de cicatrização.

Apesar de não acelerar o reparo tecidual, o tratamento oral com EHVG acentuou a contração da ferida, durante todo o experimento. Alguns estudos mostram que espécies botânicas tiveram uma ação mais tardia ou aceleradora sobre a retração da ferida. O óleo de *Ouratea* sp. iniciou o processo de retração da área da lesão no 4º dia, enquanto que o óleo de *Helianthus annuus* apresentou atividade cicatricial somente após o 7º dia (ARAUJO, 2010). O extrato hidroalcoólico de *H. drasticus* (Mart), acelerou o reparo tecidual, sendo que no 14º dia a contração da ferida era de 92%, maior do que o detectado para a fibrase, utilizada como controle positivo (66%) (VIEIRA, 2012).

O teste de calor radial, originalmente descrito por D'Amour e Smith (1941), é um teste sensível e específico para avaliar a atividade anti-nociceptiva, pois o

calor é frequentemente utilizado como um estímulo nódico, em modelos de dor. Os resultados mostraram que o EHVG apresentou ação anti-nociceptiva mais efetiva após 60 minutos, com atividade semelhante a morfina, tanto nesse intervalo, como no subsequente (120 min), indicando, que nesse modelo de dor, que houve uma progressão da ação do extrato no decorrer do tempo. Observamos também maior recrutamento celular no sangue e no baço dos animais tratados com EHVG, sugerindo um efeito adicional sobre a migração celular.

Os nossos resultados se assemelham aos descritos por outros autores que mostraram efeito analgésico de outras espécies do mesmo gênero, como ocorreu no estudo utilizando o extrato aquoso de *Vismia bacifera* no teste de edema de pata induzido por carragenina (SALAS et al., 2008; TABARES, 2007). Vale ressaltar que a dose que utilizamos foi muito menor do que a utilizada em outros estudos que detectaram atividade analgésica utilizando extrato hexânico de *Vismia*, no modelo de indução de contorções abdominais por ácido acético, utilizando doses mais elevadas, 100, 200 ou 400 mg/Kg respectivamente (NOBRE et al., 2015)

Os analgésicos de ação central, como a morfina, inibem igualmente as fases de ativação: nociceptores por um efeito central e a fase inflamatória, enquanto drogas anti-inflamatórias esteroidais (dexametasona) e não-esteroidais (acetilsalicilato) suprimem principalmente a fase tardia (TRONGSAKUL et al., 2003), sugerindo que os efeito anti-nociceptivo pode ter efeito central, entretanto outros experimentos já estão em andamento na perspectiva de esclarecer o possível mecanismo de ação do extrato.

Os animais inoculados com BCG na pata, desenvolveram uma resposta inflamatória característica de inflamação aguda nas primeiras 48 h e da inflamação crônica granulomatosa, após o 14º dia. Na fase aguda o pico observado no grupo controle, ocorreu nas primeiras 24hrs após o inoculo do BCG, enquanto isso, no grupo *Vismia*, essa reação foi quase completamente inibida até as 48 h. O mesmo ocorreu na fase crônica da reação entre o 14º e 18º dias e após o desafio com o PPD, entre o 22º e 23º dias, mostrando que o extrato apresenta ação anti-inflamatória sobre várias fases durante o desenvolvimento da resposta ao BCG.

O processo inflamatório é caracterizado por ser uma resposta dos tecidos a estímulos nocivos podendo ocasionar alterações celulares e vasculares. O edema inflamatório induzido por BCG é um modelo interessante para essa atividade, pois permite a avaliação do efeito tanto na fase aguda, dependente de imunidade inata, como na fase crônica, dependente de linfócitos T e macrófagos. (VANCREVELL et al., 2002; SARRAF; SNELLER, 2005).

Com base nessas considerações inferimos que o efeito observado, pode estar relacionado a presença de compostos com ação anti-inflamatória e também aos compostos com ação antimicrobiana, uma vez que a vacina BCG, é composta por microrganismos, inativados (VANCREVELL et al., 2002; SARRAF et al., 2005).

Para investigar se o efeito do EHVG estaria ou não relacionado a um efeito anti-inflamatório, foi investigado o perfil de células inflamatórias no sangue, linfonodo poplíteo, baço e peritônio, bem como as populações de linfócitos e macrófagos ativados ou não. Os resultados mostraram que o EHVG aumentou a população de leucócitos no sangue, bem como a migração de linfócitos para o poplíteo, entretanto, não alterou as populações celulares do baço e peritônio.

No sangue o EHVG aumentou o número de neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos têm função efetora na regulação de processos inflamatórios agudos e crônicos (COSTA, 2015). O processo inflamatório crônico é caracterizado pela formação de granulomas formados pelos infiltrados de macrófagos, linfócitos, fibroblastos e granulócitos (GAUTHIER et al., 2004). Essas células apresentam um grande efeito modulador não somente em processos de inflamação, assim como também no sistema nervoso central e lesões nervosas (MARCHAND et al., 2005).

Matushima (1994) avaliando o processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pelo BCG em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) observou a presença de células gigantes multinucleadas, tipo corpo estranho, três dias após a inoculação, que apareceram com maior frequência aos sete dias. Após o 21º dia, estas já possuíam maior organização e, aos 33º dias as células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho já podiam ser encontradas englobando grumos de BCG. Estas células também podiam ser encontradas em locais mais distantes formando “ninhos” de células inflamatórias junto com linfócitos, fibroblastos e macrófagos.

O EHVG estimulou a migração de linfócitos para o peritônio, sobretudo linfócitos T auxiliares e também no poplíteo. Sugerindo que essas células podem estar envolvidas na redução da resposta inflamatória observada. Vale ressaltar que no poplíteo a população de linfócitos T citotóxicos também estava aumentada.

Os linfócitos têm o potencial de migrar para locais de infecção, o que favorece e facilita as respostas imunes. Exercem um papel central e na resposta imune e podem influenciar quase todas as reações imunológicas (HUMBERT et al., 2017). Em geral macrófagos também estão envolvidos na resposta ao BCG, entretanto os nossos resultados mostram que o tratamento com EHVG não modificou a migração e a ativação dessa população celular em nenhum dos locais avaliados, nem mesmo quando investigados a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD86) ou a expressão de moléculas de MHC II (Iale).

Quanto a avaliação de CD486 e Iale⁺, na qual são caracterizados como marcadores de moléculas co-estimulatórias e moléculas de classe II. Adicionalmente, não detectamos alteração da produção de Peróxido de Hidrogênio tanto espontaneamente (derivada de macrófagos), como após quanto estímulo por PMA (derivada de macrófagos e neutrófilos). Os resultados obtidos se assemelham aos anteriormente descritos por Lopes et al., (2005), que ao utilizar os extratos metabólico e etanólico de *Davilla elliptica*, detectou que os mesmos não estimularam na produção de H₂O₂.

Os macrófagos são células importantes na ativação do sistema imunológico, pois, além de exercerem atividade fagocítica, são capazes de apresentar antígenos e secretar citocinas e mediadores necessários aos vários tipos de ação, nas quais estão envolvidos. Adicionalmente, nas reações ao BCG além do aumento de linfócitos T CD4⁺ ocorre também aumento e ativação de macrófagos e células de Langerhans (FLYNN et al., 2004; BEISIEGEL et al., 2009) e até células NK ativadas (BOYSEN, 2009).

Assim, os resultados em conjunto demonstram que o tratamento com EHVG não afetou nem a migração, nem a ativação de macrófagos, mesmo considerando que resultados prévios mostraram que o BCG é um bom ativador dessa população celular (NASCIMENTO et al., 1996).

Sob condições fisiológicas normais o peróxido de hidrogênio é gerado em baixas quantidades sendo rapidamente utilizado ou degradado. Em altas concentrações e longas exposições por este mediador, pode ocorrer a destruição de estruturas celulares além de levar a um dano celular irreversível. O H₂O₂ apresenta toxicidade para as células podendo ser também responsável pela morte de bactérias fagocitadas (RAMASARMA et al., 1990).

O EHVG também não teve efeito sobre a produção de citocinas inflamatórias, e a dosagem de outras citocinas Th1 e Th2 não foi sequer mensurável, pois todos os resultados foram negativos (dados não apresentados). Nesse caso é possível que um problema metodológico tenha afetado essa avaliação, pois a produção de citocinas avaliada pela técnica de CBA, tem tido resultados inconstantes. Dessa forma, estamos aguardando a chegada de anticorpos para que essas dosagens sejam repetidas por ELISA, para confirmar os resultados obtidos.

A outra possibilidade se refere a ação imunossupressora relatada por Guerra (1996), uma vez que segundo a autora o tratamento com *V.guianensis*, foi capaz até de inibir a rejeição a transplantes em concentrações semelhantes a que utilizamos no presente estudo. Corroboram com essa possibilidade os resultados obtidos por Oliveira et al., (2017), ao mostrar que os extratos etanólicos das folhas e da casca de *V. guianensis*, reduziram tanto a produção de óxido nítrico, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, com exceção de TNF- α , devido ao aumento de IL-10, como evidência de um potencial efeito anti-inflamatório associado.

As citocinas são mediadores proteicos e estão envolvidas em todas ou quase todas as interações do sistema imunológico. Apresentam estruturas diversificadas com uma variabilidade de funções, tais com: moléculas mensageiras, na qual podem transmitir sinais de um tipo celular para outro, instruem a célula que recebe o sinal a proliferar-se, diferenciar-se, secretar outras citocinas, migrar ou morrer (ROITT et al., 2013).

Concluimos que o extrato de *Vismia guianensis* não apresenta efeito cicatrizante, mas tem ação analgésica, que pode se intensificar com a avaliação de doses maiores e outros protocolos para avaliar a atividade anti-nociceptiva. Apresentou também efeito anti-inflamatório tanto na fase aguda como na fase crônica, possivelmente devido a ativação de linfócitos T auxiliares, mesmo sem

que tenha ocorrido aumento ou ativação na população de macrófagos nos vários sítios avaliados. Importante mencionar, que as folhas, mas não os frutos apresentam ação inibitória da alfa-amilase, sugerindo uma possível ação anti-diabetes. Em conjunto os dados mostram que o extrato é um importante alvo para bioprospecção de produtos bioativos devido a multiplicidade de ações que apresenta.

6. CONCLUSÕES

- A análise dos dados fornece um avanço importante no entendimento das propriedades farmacológicas da espécie *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, especialmente das folhas.
- O EHVG não apresentou toxicidade quando administrado por via oral, não teve atividade cicatrizante, mas apresentou ação anti-diabetes, anti-nociceptiva e anti-inflamatória tanto na fase aguda, quanto na crônica em resposta ao BCG.
- Este trabalho é pioneiro em abordar a ocorrência da ação anti-inflamatória e anti-nociceptiva, de baixas doses do extrato da folhas de *V.guianensis*, utilizado por via oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, R.A.; BLOSE, D.A. Delayed hypersensitivity skin testing: A review. Arch Dermatol 1983;119:934.
- ALVAREZ, R.E. et al. Antioxidant activity and phenolic content of extracts from barriers of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). Vitae, v. 15, n. 1. p. 165-172, 2008.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da COFID (Versão V). Brasília, janeiro de 2015.
- ARAUJO, A. K. L., Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea* sp. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceara, Faculdade da Argentina, S.C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. Vivências. v.7, n.12, p.51-60, maio 2010
- BALBINO, C. A, PEREIRA, L. M. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Ver. Brasileira Ciências farmacêuticas. 2005, v. 41, n. 1, p. 25-51. INSS 1516-0332.
- BEISIEGEL, M.; MOLLENKOPF, H. J.; Combination of host susceptibility and *Mycobacterium tuberculosis* virulence define gene expression profile in the host. European Journal of immunology, v. 39, p. 3369-3384, 2009.
- BITTRICH, V.; TRAD, R.J.; CABRAL, F.N.; NASCIMENTO-JR, J. E.; SOUZA, V.C. Hypericaceae in lista de espécies da flora do Brasil jardim botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25586>.
- BORGES, G.S. et al. “Toxicity of structurally related anthraquinones and anthrones to mammalian in vitro”. Toxicol. In vitro, 8: 329, 1994.
- BOYSEN, P.; STORSET A. K. Bovine natural killer cells. Veterinary Immunology and immunopathology, Amsterdam, v.130, p. 163-177, 2009.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao Diabetes Mellitus. Campanha nacional de detecção de suspeitos de Diabetes Mellitus. Relatório técnico. Brasília: 2001.
- BROUGHTON G, JANIS, J.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. Plastic Reconstructive Surgery, vol. 11, p.12S-34S, 2006.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle de medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia, v.11, p.26-32, jun. 2007.
- CASTRO. A. S. Efeitos de *Morus nigra* L sobre a resposta inflamatória e modulação de neutrófilos: estudos in vitro e in vitro. Tese de doutorado – Rede Nordeste de Biotecnologia – Universidade Federal do Maranhão, 2016.
- CHAN. J.; FLYNN. J. The immunological aspects os latency in tuberculosis. Clin. Immunol. 2004; 110(1): 2-12.

- CHEN, Y., JUNGER, W. G. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Leucocytes: methods and Protocols*, 115-124. (2012).
- CLARK, R. A. F.; Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: *Pathologic Basis of Disease*, 7th ed., Ed. Saunders, p.112, 2005.
- CONAHGAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatol Int*, v. 32, n. 6, p. 1491- 502, Jun 2012.
- COSTA, M.F. Extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia aurata* e de *Eugenia puniceifolia* (HBK) inibe a migração neutrofílica por mecanismos distintos. 2015. 70 f.: il. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista. Assis, 2015.
- DANNENBERG, A.M.: Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991;12;228.
- D'AMOUR F, SMITH D. Um método para determinar a perda da sensação de dor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1941; 72 (1): 74-79.
- DELLE MONACHE, D.F. et al. 1979a, p. 301. In: DELLE MONACHE D. F.; et al. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxy and γ,γ -hidroxy-feruginin A. *Journal of Natural Products*. v. 43, n. 4, p. 487-494, 1980.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. Ed. São Paulo: Unesp, 2002.
- DOHERTY, M.L.; BASSETT, H.F.; QUINN, P.J.; DAVIS, W.C.; KELLY, A.P.; MONAGHAN, M.L. A sequential study of the bovine tuberculin reaction *Immunology.Oxford*, v .87, n.1, p.9-14, 1996. .
- FRAZER, I.H. et al: Assessment of delayed-type hypersensitivity in man. A comparison of the “multitest” and conventional.
- GAUTHIER, D. T.; VOGELBEIN, W. K.; OTTINGER, C. A. Ultrastructure of *Mycobacterium marinum* granuloma in striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. v. 62, p. 121-132, 2004.
- GOMES, M.J.N. Estudos das ações farmacológicas da folha de *Vismia reichardtiana*. (O.Ktze), Ewan-Guttiferrae. (Monografia de Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil,1992.
- GONÇALVES, M.L. S Contribuição para o estudo fitoquímico do lacre, *Vismia reichardtiana* (O. Ktze), Ewan-Guttiferrae. Rio de Janeiro, RJ, 1970. (Dissertação mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- GONZALES, J.G. et al. Chemistry of the genus *Vismia*. Part VII. *Vismione A* from the leaves of *Vismia guianensis*. *Planta Médica*, v. 40, p. 347-350, 1980.
- GRANGE, J. M. GIBSON, J. OSBORN, T. W. COLLINS, C. H. Yates MD. What is BCG? *Tubercle*. 1983; 64:129-3

GROSSE, B.K., BALASUBRAMANIAN, V., KAPADIA, G.J. Isolation and characterization of prenylated anthranoids from *Vismia guianensis*. In: 38th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, The University of Iowa City, Iowa, July 26-30, 1997.

GUERRA, R. N. M. Atividade imunossupressora dos frutos de *Vismia reichardtiana*. (Tese de doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1996.

GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F.; BORGES, M. J. C.; SOUSA, O.V.; MATTAR, N. S. Atividade Supressora de *Vismia reichardtiana* sobre a produção de anticorpos em camundongos infectados com *S. mansoni*. In: XVII Reunião Anual da Federação Brasileira de Sociedade de Biologia Experimental. São Paulo, Resumo, 1993.

GUERRA, R.N.M.; GONÇALVES, M.L.S. Estudos preliminares sobre a introdução dos frutos de *Vismia reichardtiana* na alimentação: Avaliação dos efeitos sobre o sistema imunológico de C57BL/6. Anais do I Encontro de Pesquisadores do Maranhão, São Luís, MA, 1991.

GUO, D. L. A. "Factors Affecting Wound Healing." *Journal of Dental Research* 89.3 (2010): 219–229. *PMC*. Web. 5 Sept. 2018.

HASSELSTROM et al. Physical fitness and physical activity during adolescence as predictors of cardiovascular disease risk in young adulthood. Danish youth and sports Study: an eight-year follow-up study. *International journal of sports medicine*, v. 23, p 27-31, 2002.

HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, n 2, p. 53-58, 2007.

HUMBERT et al. 2017. Modelagem de Respostas de Células T Periféricas por Células Endoteliais Linfáticas. *Frente. Immunol.*, 12 de janeiro de 2017.

HUSSAIN, H., et al. Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n.11, 2012. *J. Ethnopharmacol.*, 105 (2006), p. 131. *J. Trad. Med.*, 3 (2008), p. 211

JAMES, L.; LESLIE, P. G. *Tratado de Histologia*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 472p.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KOH, T. J.; DiPIETRO, L. A. "Inflammation and Wound Healing: The Role of the Macrophage." *Expert reviews in molecular medicine* 13 (2011): e23. *PMC*. Web. 5 Sept. 2018.

LIMA JUNIOR, J. F.; DIMENSTEIN M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: Visão do odontólogo. *Saúde*, Piracicaba, v. 8, n. 19, p. 37-44, 2006.

LOPES, et al. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(1): 44-50, Jan/Mar. 2005

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, Nova Odessa: São Paulo, 2002. p. 512.
- MACFOY, C.A; SAMA, A. M. Medicinal Plants in Pejehun district of Sierra Leone. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 8, p. 215-223, 1983.
- MANDELBAUN et al.; Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. *Rio de Janeiro*, 78(4):393-410, jul./ago. 2003.
- MARCHAND, F. PERRETTI, M. MCMAHON, S.B. Role of the Immune system in chonic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(7):521-32.
- MATUSHIMA, E. R. Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo. 1994. 120 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- MBAVENG, E. M, KUETE, J.R. KROHN, K. NKENGFAK, A. E. MAYER, L.L.M, LALL, N. Antimicrobial activity of the extracts and compounds from *Vismia guineensis* (Guttiferae) *Asian Journal of Traditional Medicine*. 2008; 3:211–223.
- MCGETTIGAN, P.; HENRY, Dv. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. *PLoS Med*, v. 8, n. 9, p. 100-1009, 2011.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p.428-425, 2008.
- MELO, A.F.M.; Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 202-205, 2006.
- MELO-DE-PINNA G.F.; ALMEIDA-CORTEZ-Cortez J.S. Morfologia e anatomia de uma mina de folhas em *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae) em um fragmento de Mata Atlântica brasileira *Braz. J. Biol.*, 66 (2B) (2006), pp. 759 – 763
- MENAN, H. et al. Atividade antiplasmodial e citotoxicidade de plantas usadas na medicina tradicional da África Ocidental para o tratamento da malária. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 105, Questões 1–2 , 21 de abril de 2006, páginas 131-136.
- MENDONÇA, R.J.; NETTO, J.C. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros em Dermatologia*, v.84, n.3, p.257-262, 2009.
- MEZZANA, P.; A eficácia clínica de um novo gel a base de quitina monofibrilas na cicatrização de feridas. *Acta Chris. Plast*. v. 50 p. 81-4, 2008.
- MIRAGLIA, M.C.M. et al. Anthraquinones from *vismia* species. *Phytochemistry*, v. 20, n. 8, p. 2041-2042, 1981.
- MUIIR III, W. W. Dor e estresse. In: MUIIR III, W. W.; GAYNOR, J. S. *Manual de controle da dor em Medicina Veterinária*. 2. Ed. São Paulo: MedVet, cap. 2, 2009, p. 13-41.

NAGEN, T. J.; De OLIVEIRA, F.F. Xanthenes and other constituents of *Vismia parviflora*. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 8, p. 505-508, 1997.

NAIDU, R. K.; PHAM, T. M. Pain management. In: SIKKA, P. K.; BEAMAN, S. T.; STREET, J. A. Basic Clinical Anesthesia. New York: Springer, 2015. p. 265-296.

NASCIMENTO, F. R. F. Atividade citotóxica e produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral por macrófagos peritoneais co-cultivados com células tumorais L929. Dissertação (mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de imunologia. 1996.

NEWMAN, D J.; CRAGG, G, M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014. Journal of Natural Products 2016, 69, 629

NOBRE et al. Atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória do extrato hexânico das folhas de *Vismia guianensis* Aubl. em camundongos. Rev. Ciênc. Méd. Biol., v. 14, n. 1, p. 69-73, 2015

OLIVEIRA et al. Clusiaceae Lindl. e Hypericaceae Juss. nas restingas do Estado do Pará, Amazônia Oriental, Brasil. Biota Amazônia open journal system. Macapá, v. 5, n. 4, p. 15-21, 2015.

OLIVEIRA, A. H. Atividade antimicrobiana e imunológica in vitro dos extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, A.H.; OLIVEIRA, G. G.; CARNEVALE, F.; PONTUONDO, DUHARTE-BATISTA, A. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. Journal of Ethnopharmacology, v.195, p. 266–274, 2017.

OMS - World Health Organisation. Immunization, surveillance, assessment and monitoring. Reported estimates of BCG coverage; updated 16 December 2008

PASQUA, G. et al. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* D.C. Protoplasma, 189, n. 1-2, p. 9-16, 1995.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas. 1926.

POLITI, M. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. Phytochemical Analysis, v.15, p. 355-364, 2004.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. Indian J Biochem Biophys 27: 269-274. 1990

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. Zeitschrift fur Rheumatologie, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.

ROITT, I. M. et al. Fundamentos de imunologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 552, 2013. ISBN 978-85-277-2142-4

SAASTAMOINEN, P. et al. Socio-economic differences in the prevalence of acute, chronic and disabling chronic pain among ageing employess. Pains. Amsterdã, v. 114, p. 464-371, 2005.

SALAS, F. et al. Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* L. var. dealbata (Guttiferae) em animales de experimentación. Rev. Fac. Farm., Mérida, v. 49, n. 1, p. 5-9, 2008.

SANTOS, A.L.; et al. Ensaio microbiológico dos extratos e frações da *Vismia guianensis*. Clusiaceae. (Aubl.) Pers. In: 30º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia - SP. Anais Livro de resumos do 30º RASBQ, v. único. Águas de Lindóia - SP: SBQ, 2007.

SARRAF, P; SNELLER, M.C. Pathogenesis of granuloma formation Expert Reviews in Molecular Medicine London, v 7; n8; 2005.

SCHULTZ, G. S.; SIBBALD, R.G.; FALANGA, V.; AYELLO, E.A.; DOWSETT, C.; HARDING, K.; ROMANELLI, M.; STACEY, M.; TEOT, L.; VANSCHIEDT, W. Wound bed preparation a systematic approach to wond management. Wound Repair. v. 11. p. 1-26, 2003.

SEO, E.K. et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. Phytochemistry, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

SILVESTRE, R. G.,; MORAES, M.M.,; LINS, A.C.S.,; RALPH, M. T, FILHO-LIMA, J. V.,; CAMARA, C. A.,; SILVA, T.M.S. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. African Journal of Biotechnology, v. 11, p. 9888-9893, 2012.

SIQUEIRA, JR., FREITAS, J.; SABOIA, C. J. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. 1. Edição, São Paulo, SP. Medsi, 2000. 238p.

SMITH, C.M.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M.A.; MARKS, D.B. Metabolism of the eicosanoids. In: Mark' Basic Medical Biovhemistry: a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 654-667.

SPINOSA, H.S. GORNIAC S.L., BERNARDI, M.M. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária. 4ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. p. 239-272.

STARKE, J.R, CONNELLY, K. K. Bacilli Calmette-Guerin vaccine. In: Plotkin MEA, editor. Vaccines. Philadelphia: WB Saunders; 2004. p. 456-89

SUFFREDINI I. B. et al.; In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. Pharmzie, v. 62, n.10, p. 798-800, 2007.

TABARES, C. X. B. Evolução farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. Espanha: Universidad de La Laguna, 2007. 123 p. (Tesis Doctorales).

TAKAKI, E. Y.; MODESTO Jr, M. S.; FIGUEIREDO, L. H. M. Proteção intelectual e análise de mercado da biodiversidade brasileira. *Revista Ciências Agrárias*. Belém, n 48, p.143-159, jul./dez. 2007.

TALA. M. F, et al.; Antraquinonas e triterpenóides de sementes de *Vismia guineenses*. *Sistemática Bioquímica e Ecologia*. Volume 50 , outubro de 2013, páginas 310-312.

TORRES, I.L, VASCONCELOS, A. P, CUCCO, S. N. S, et al. Effect of repeated stress on novelty induced anti-nociception in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001, 34:241–4.

TRONGSAKUL, S. et al. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. *J. thnopharmacol.*, Lausanne, v. 85, n. 2-3, p. 221-225, 2003.

UHL, C. “Factors controlling succession following slash-and burn agriculture in Amazonia”. *J. Ecology*, v.75, p.377, 1987.

UMA, K., HUANG, X., KUMAR, B.A., 2016. Antifungal effect of plant extract and essential oil. *Chin. J.Integr. Med. Sep*, 3. <http://dx.doi.org/10.1007/s11655-016-2524-z>.

VANCREVEL, R.; TOM, H.M. OTTENHOFF.; JOS, W.M.; MEER, V.D. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.15, n.2, p.294-309, 2002.

VASCONCELOS, D. A.; LIMA, M. M. O.; ALCOFORADO, G. G. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular na região do centro do município de Floriano/PI. V Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação, Maceió, 2010. *Anais CONNEPI 2010*, 2010.

VERRI, J. R, W.A, CUNHA, T, M., PARADA, C.A., POOLE, F.Q.C., FERREIRA, S.H. Hyperociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 116-138, 2006.

VIEIRA, D. A.; Estudo das propriedades farmacológicas das cascas de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel em modelos de analgesia, inflamação e cicatrização em camundongos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2012.

WHO et al. Global Tuberculosis Report 2013.” 2014. *WHO*. Accessed January 11. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.