



LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MOLECULAR
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

DÉBORAH MARA COSTA DE OLIVEIRA

TRIAGEM DE CINCO ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS USADAS NA
AMAZÔNIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SECREÇÃO DE HISTAMINA

BELÉM

2013

DÉBORAH MARA COSTA DE OLIVEIRA

TRIAGEM DE CINCO ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS USADAS NA
AMAZÔNIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SECREÇÃO DE HISTAMINA

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador (a): Prof^ª Dra Maria Elena Crespo López.

BELÉM

2013

DEDICO...

A minha amada mãe Leonor Costa de Oliveira pela garra e apoio incondicional em todos os momentos dessa batalha e de todas da minha vida!

Ao meu amado pai Valdemir de Oliveira pelo apoio, ensinamentos, conselhos e consolo de sempre!

Ao meu grande amor Arthur, meu filho.

Muito obrigada por tudo !!!

A Deus, o grande arquiteto do universo, que rege meus caminhos e abençoa minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a María Elena Crespo Lopez pelos grandes ensinamentos e paciência.

Ao professor Luiz Claudio Di Stasi por todo o apoio e ensinamentos, ao Dr. Osmar Lameira pelo direcionamento e parceria. A pesquisadora Nádia Paracampo por todo o apoio. Aos demais membros da banca pelas experiências repassadas e disponibilidade.

Aos meus colegas de jornada e amigos que apoiaram de perto ou de longe.

DÉBORAH MARA COSTA DE OLIVEIRA

TRIAGEM DE CINCO ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS USADAS NA AMAZÔNIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SECREÇÃO DE HISTAMINA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Maria Elena Crespo López

Data: 20 de dezembro de 2013

Banca

Prof^ª. Dra. Maria Elena Crespo López.

Laboratório de Farmacologia Molecular/ICB/UFPA

Prof.Dr.Luiz Claudio Di Stasi

Laboratório de Fitomedicamentos/IBB/UNESP

Prof.Dr. Pergentino José da Cunha Sousa

Laboratório de Farmacodinâmica/ICS/UFPA

Prof. Dr. Osmar Alves Lameira

Laboratório de Biotecnologia /EMBRAPA -Amazônia Oriental

Prof^ª Dra. Vanessa Jóia de Melo

Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais/ICB/UFPA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato Ciclase
ANOVA	Análise de Variância
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
Ach	Acetilcolina
A23187	Ionoforo de Cálcio A23187
A	Concentração da Amostra-teste
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
Fc γ RII	Receptor de Alta Afinidade para Imunoglobulina G
Fc ϵ RI	Receptor de Alta Afinidade para Imunoglobulina E
FrHex	Fração Hexânica
FrAcEta	Fração Acetato de Etila
FrAq	Fração Aquosa
FT	Teor de Fenóis Totais
F	Concentração de Fenóis da Amostra-teste
FAP	Fator de Ativação Plaquetaria
HcL	Ácido Clorídrico
H1	Receptor de Histamina 1
H2	Receptor de Histamina 2
H3	Receptor de Histamina 3
H4	Receptor de Histamina 4

5-HT	5-hidroxitriptamina
5-H.T	Serotonina
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
ICH	Conferência Internacional Sobre a Harmonização
ID	Dano Celular/Tipo de Dano
IP3	Inositoltrifosfato
IL-1	Interleucina 1
LH	Liberação de Histamina
LT sup.	Linfócito T supressor
LT aux.	Linfócito T auxiliar
MAPKs	Proteínas quinases Ativadoras de Mitose
M _T	Mastócito triptase
M _{TC}	Mastócito triptase/quimase
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NAV	Nodo Átrio Ventricular
NA	Noradrenalina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PK	Proteína Quinase
PLC	Fosfolipase C
PGE ₁	Prostagladina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGD ₂	Prostagladina D ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F ₂ Alfa
PCA	Reação de Anafilaxia Passiva Cutânea
RPMI	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	28
Figura 2	Distribuição geográfica de <i>Morinda citrifolia</i> Linn.	29
Figura 3	<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohman	31
Figura 4	Distribuição geográfica de <i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohman	31
Figura 5	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	33
Figura 6	Distribuição geográfica de <i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	34
Figura 7	<i>Luehea speciosa</i> Willd	36
Figura 8	Distribuição geográfica de <i>Luehea</i>	37
Figura 9	<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Raldk)	39
Figura 10	Distribuição geográfica de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Raldk)	40
Figura 11	Dosagem de compostos fenólicos	59
Figura 12	Efeito do veículo DMSO sobre a liberação espontânea de histamina	60
Figura 13	Efeito do extrato etanólico de frutos <i>Morinda citrifolia</i> Linn sobre a liberação de histamina	61
Figura 14	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Morinda citrifolia</i> Linn sobre a liberação de histamina	62

Figura 15	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohman sobre a liberação de histamina	63
Figura 16	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry sobre a liberação de histamina	64
Figura 17	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Luehea speciosa</i> Willd sobre a liberação de histamina	65
Figura 18	Efeito do extrato etanólico de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) sobre a liberação de histamina	66
Figura 19	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) sobre a liberação de histamina	67
Figura 20	Determinação da genotoxicidade do extrato de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk)	68
Figura 21	Índice mitótico de cultura de linfócitos humanos expostos ao extrato de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk)	69
Figura 22	Perfil cromatográfico do extrato de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) e suas frações.	70
Figura 23	Efeito da fração aquosa do extrato etanólico de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) sobre a liberação de histamina	71
Figura 24	Efeito da fração acetato de etila acetato do extrato etanólico de casca de	72

Connarus perrottetii var.
angustifolius (Radlk) sobre a
liberação de histamina

Figura 25

Efeito da fração hexânica do
extrato etanólico de casca de
Connarus perrottetii var.
angustifolius (Radlk) sobre a
liberação de histamina

73

Lista de Quadros

Quadro 1	Mediadores bioquímicos liberados de mastócitos	17
Quadro 2	Receptores e efeitos da histamina	21
Quadro 3	Receptores de histamina, localização e mecanismo de transdução	22
Quadro 4	Plantas medicinais selecionadas para este estudo com descrição das partes utilizadas e indicações etnomedicinais	27
Quadro 5	Identificação das plantas medicinais usadas no presente estudo	43
Quadro 6	Rendimento das amostras das plantas	53
Quadro 7	Rendimentos dos extratos	54
Quadro 8	Teor de umidade	55
Quadro 9	Prospecção fitoquímica	58
Quadro 10	Dosagem de compostos fenólicos	59
Quadro 11	Rendimento das frações de extrato de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk)	69

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde recomenda o estudo e o uso de plantas medicinais regionais, como fonte de recursos para diminuir os custos dos programas de saúde pública e ampliar o número de beneficiários, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Na Amazônia, a prática da fitoterapia já é parte integral da cultura tradicional, mas em muitas ocasiões existe uma profunda carência de conhecimento científico sobre o efeito dessas plantas. Portanto se torna essencial o estudo com base científica que justifique ou não a indicação dessas plantas para o tratamento ou prevenção doenças. Nesse contexto, as doenças alérgicas são a segunda maior complicação que afeta significativamente a qualidade de vida da população. Nas alergias, os mastócitos são células efetoras chaves participando através da liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, entre eles a histamina. A estabilização de mastócitos e, portanto a inibição da liberação de histamina seria um fator primordial na prevenção e/ou controle das alergias. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antialérgico de 5 espécies oriundas ou adaptadas na Amazônia *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) (barbatimão do pará), *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann (pariri), *Luehea speciosa* Willd (açoita cavalo), *Morinda citrifolia* Linn (noni) e *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry (cipó d'alho) através da análise de secreção de histamina. Foi realizada a prospecção fitoquímica de extratos brutos etanólicos a 70% de cada espécie de planta (fruto, folhas e/ou casca) e avaliada a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato incubados *in vitro* com diferentes concentrações dos extratos e/ou com agentes secretores (composto 48/80 e ionóforo A23187). O presente trabalho mostra pela primeira vez a ação inibitória dessas cinco plantas medicinais sobre a liberação de histamina. Dentre essas 5 plantas, o extrato que demonstrou um efeito mais potente foi o da casca da *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk). Um estudo mais aprofundado desse extrato revelou uma baixa toxicidade aguda e a ausência de genotoxicidade, o que apoiaria seu uso como planta medicinal. As frações aquosa, hexânica e de acetato de etila desse extrato também apresentaram potente efeito inibitório sobre a liberação induzida de histamina. A análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada revelou a presença de taninos condensados, catequinas e flavonoides que poderiam ser os responsáveis por esses potentes efeitos. Mediante os resultados obtidos, novas bases científicas são formadas para elucidação das informações etnofarmacológicas de plantas tradicionalmente utilizadas na região amazônica. Assim, a possibilidade de investigar alternativas terapêuticas com estes extratos, contra as afeções alérgicas ou condições em que a secreção de mastócitos seja relevante, pode favorecer sobretudo a populações de baixa renda e que habitam áreas com acesso restrito aos centros de saúde, como muitas vezes ocorre na Amazônia, mas que por outro lado tem acesso direto às plantas medicinais.

Palavras-chave: mastócitos, alergia, *Luehea speciosa*, *Connarus perrottetii*, *Mansoa alliacea*, *Fridericia chica*, *Morinda citrifolia*.

SUMMARY

The World Health Organization recommends the study and use of regional medicinal plants as a source of resources to reduce the costs of public health programs and increase the number of beneficiaries, especially in underdeveloped and developing countries. In the Amazon, the practice of herbal medicine is now an integral part of traditional culture, but on many occasions there is a profound lack of scientific knowledge about the effect of these plants. Therefore it is essential to study the scientific basis or not the indication of these plants for treating or preventing diseases. In this context, allergic diseases are the second leading complication that significantly affects the quality of life. In allergies, mast cells are key effector cells participating through the release of several pro-inflammatory mediators, including histamine. The stabilization of mast cells and thus inhibiting histamine release would be a key factor in the prevention and / or control of allergies. Thus the aim of this study was to evaluate the antiallergic potential of 5 or adapted species from the Amazon *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) (barbatimão do pará), *Fridericia chica* (Bonpl.) LG Lohmann (pariri), *Luehea speciosa* Willd (coita cavalo) , *Morinda citrifolia* Linn (noni) and *Mansoa alliacea* (Lam.) AH Gentry (cip de alho) through the analysis of histamine secretion. Phytochemical screening of the ethanolic crude extracts to 70 % of each plant (fruit, leaves and / or bark) was performed and evaluated the release of histamine from peritoneal mast cells of rat incubated in vitro with different concentrations of the extracts and / or secretory agents (compound 48 /80 and A23187 ionophore). The present study demonstrates for the first time the inhibitory action of these five medicinal plants on the release of histamine. Among these 5 plants, the extract that showed a more potent effect was peeling *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk). Further study of this extract showed a low acute toxicity and lack of genotoxicity, which would support its use as a medicinal plant. The aqueous hexane and ethyl acetate fractions of this extract also showed potent inhibitory effect on histamine release induced. The phytochemical analysis by thin layer chromatography revealed the presence of tannins, catechins and flavonoids that could be responsible for these potent effects. Through our results, new scientific bases are formed to elucidate the ethnopharmacological information on herbs traditionally used in the Amazon region. Thus, the possibility of investigating alternative therapies with these extracts against allergic affections or conditions in which the secretion of mast cells is relevant, may especially favor the low-income populations and living in areas with limited access to health centers, as often occurs in the Amazon, but otherwise has direct access to medicinal plants.

Keywords: mast cells, allergy, *Luehea speciosa*, *Connarus perrottetii*, *Mansoa alliacea*, *Fridericia chica*, *Morinda citrifolia*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Uso de fitoterápicos e plantas medicinais	14
1.2	Processos Alérgicos	15
1.3	Uso de plantas medicinais na alergia e na região Amazônica	25
1.4	Aspectos botânicos, distribuição geográfica e etnofarmacologia das espécies das plantas usadas nesse estudo.	28
1.4.1	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.....	28
1.4.2	<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann.....	30
1.4.3	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry.....	32
1.4.4	<i>Luehea speciosa</i> Willd	35
1.4.5	<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk).....	38
1.5	Potencial genotóxico das plantas medicinais.....	41
2	OBJETIVOS.....	42
2.1	Geral.....	42
2.2	Específicos	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Material Vegetal	43
3.1.1	Colheita.....	43
3.1.2	Identificação	43
3.1.3	Obtenção dos extratos.....	44
3.2	Análise fitoquímica.....	45
3.2.1	Prospecção fitoquímica qualitativa.....	45
3.2.2	Doseamento de compostos fenólicos totais	45
3.3	Fracionamento dos extratos	46
3.3.1	Rendimento das frações.....	46
3.4	Cromatografia de camada delgada.....	46
3.5	Dosagem de histamina	47
3.5.1	Animais.....	47
3.5.2	Obtenção das suspensões celulares contendo mastócitos.....	47
3.5.3	Exposição das suspensões celulares às soluções dos extratos.....	47
3.5.4	Extração e dosagem automática de histamina	48
3.6	Avaliação da toxicidade aguda	49

3.6.1	Animais.....	49
3.6.2	Teste de toxicidade aguda.....	49
3.7	Avaliação do potencial Genotóxico.....	50
3.7.1	Obtenção da cultura de linfócitos humanos.....	50
3.7.2	Técnica de determinação de aberrações cromossômicas (AC):	51
3.8	Análise estatística	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Rendimento das amostras das plantas.....	53
4.2	Rendimento dos extratos concentrados.....	54
4.3	Teor de umidade dos extratos	55
4.4	Perfil Fitoquímico	56
4.4.1	Prospecção fitoquímica qualitativa.....	56
4.4.2	Dosagem de compostos fenólicos totais.....	59
4.5	Dosagem de histamina	60
4.5.1	Efeito do veículo (dimetilsulfóxido - DMSO) sobre a secreção espontânea de histamina de mastócitos peritoneais de rato.	60
4.5.2	Efeito dos extratos de <i>Morinda citrifolia</i> Linn sobre a liberação de histamina.	61
a)	Extrato dos frutos	61
b)	Extrato das folhas.....	62
4.5.3	Efeito do extrato de folhas de <i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann sobre a liberação de histamina.	63
4.5.4	Efeito do extrato de folhas de <i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry sobre a liberação de histamina.	64
4.5.5	Efeito do extrato de folhas de <i>Luehea speciosa</i> Willd sobre a liberação de histamina.	65
4.5.6	Efeito dos extratos de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) sobre a liberação de histamina	66
a)	Extrato da casca.....	66
b)	Extrato de folhas	67
4.6	Análise toxicológica do extrato que apresentou maior potência e eficácia na diminuição da liberação de histamina: toxicidade aguda e genotoxicidade do extrato de casca da <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk).	68
4.6.1	Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico 70% da casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk).....	68

4.6.2	Determinação da genotoxicidade do extrato etanólico da casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk).....	68
4.7	Análise das frações do extrato de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var <i>angustifolius</i> (Radlk).....	69
4.7.1	Rendimento das frações hexânica, acetato de etila e aquosa do extrato de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var <i>angustifolius</i> (Radlk).....	69
4.7.2	Perfil fitoquímico do extrato bruto e das frações da casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) pelo método de cromatografia em camada delgada .69	
4.7.3	Dosagem de histamina na presença das frações aquosa, acetato de etila e hexânica do extrato de casca de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i>	71
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	93
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de fitoterápicos e plantas medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) na assembleia “Saúde para todos no ano 2000” recomendou o estudo e o uso de plantas medicinais regionais como fonte de recursos para diminuir os custos dos programas de saúde pública e ampliar o número de beneficiários, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 1993; Lameira & Pinto, 2008).

Esta recomendação, aliada a outros fatores regionais, tais como o difícil acesso da população de baixa renda aos centros de saúde e aquisição de medicamentos de alto custo, tem contribuído para fazer crescer o uso das plantas medicinais (Lameira & Pinto, 2008). Só nas últimas décadas observou-se um aumento expressivo no mercado mundial dos medicamentos fitoterápicos de cerca de US\$20 bilhões anuais. No Brasil, estima-se que as vendas de produtos derivados de plantas alcançaram US\$550 milhões (Lameira & Pinto, 2008).

A biodiversidade brasileira, sobretudo a diversidade da flora amazônica faz com que a região ocupe uma posição de destaque na exploração e desenvolvimento de novas substâncias provenientes de fontes naturais, devido a grande variedade de espécies de plantas com potencial terapêutico para o tratamento e prevenção de doenças.

Porém conseqüentemente a recomendação da OMS trouxe a necessidade de conhecer melhor os efeitos e a toxicidade do uso de espécies de plantas sem eficácia comprovada ou possivelmente tóxicas. Isto é importante considerando-se que na Amazônia assim como em outras partes do mundo, a prática do uso de produtos oriundos de plantas medicinais já é parte integral da cultura tradicional (Lameira & Pinto 2008).

Deste modo, cada vez mais se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas para prover base científica que justifique ou não a indicação popular de plantas para o tratamento ou prevenção de determinada doença, ao lado de estudos que avaliem também a segurança quanto ao uso, e que incluam um controle de qualidade da material vegetal. Extratos e óleos essenciais obtidos de plantas medicinais brasileiras usadas pela população no tratamento de diversas enfermidades possuem atividade biológica comprovada tanto *in vitro* como *in vivo* (Basso et al., 2005), incluindo a atividade contra sintomas de doenças alérgicas (Soares et al., 2002).

As alergias são consideradas a segunda maior complicação que afeta significativamente a qualidade de vida da população (Singh et al. 2012).

Estima-se que nos últimos 20 anos a incidência de doenças alérgicas respiratórias aumentou 40% em alguns países. Em um estudo sobre a prevalência de doenças alérgicas no Brasil, a região amazônica, representada pela região norte, está entre as que apresentam maiores índices de asma em crianças e adolescentes (Rosário-Filho et al. 2007). Entre as cidades pesquisadas Belém capital do estado do Pará foi a que apresentou maior percentual de casos de asma, rinoconjuntivite e dermatite atópica (Rosário-Filho et al. 2007).

1.2 Processos Alérgicos

O termo alergia está relacionado a uma modificação da reatividade do organismo de um indivíduo ao contato com antígeno específico sendo geralmente um processo localizado, mas pode ser sistêmico e em alguns casos ocasionar óbito (Singh et al. 2012).

As reações alérgicas são decorrentes em geral da interação de imunoglobulina E a um antígeno específico, produzindo nos mastócitos e basófilos, sequências de reações bioquímicas as quais estabelecem subsequentemente, a liberação de mediadores químicos da inflamação que causam sinais e sintomas característicos.

Quando reação alérgica ocorre de maneira aguda, é denominada de reação de hipersensibilidade imediata ou do tipo I (Gomes & de Oliveira, 2012). Portanto, o processo alérgico é um tipo de resposta inflamatória, uma vez que nela as alterações vistas na inflamação também estão presentes ao lado das alterações típicas alérgicas. Entretanto o que ocasiona o início do processo alérgico, não é um dano em geral como o corre na inflamação, e sim, a presença de um alérgeno.

Por definição, alérgeno são antígenos específicos (grupos de proteínas com diferentes estruturas e funções) que estimulam a produção de anticorpos IgE e por consequência, são capazes de causar a formação e liberação dos mediadores pró-inflamatórios (Gomes & de Oliveira, 2012).

Estes antígenos podem ser classificados em: aero-alérgeno (por exemplo: poeira); alérgeno de animais (epitélio, saliva, etc.); alérgeno de contato (pigmentos, metais, etc.); produtos de inoculação ou ingestão (fármacos e alimentos) e parasitas.

No organismo de um indivíduo serão produzidas tantas imunoglobulinas E diferentes quantas sejam os diferentes alérgenos com os quais tenha reagido (Alberts et al., 2010). Durante a hipersensibilidade imediata ocorrem mecanismos que interligam diferentes tipos celulares com funções que modulam a reação.

O macrófago, por exemplo, atua como célula responsável pela fagocitose do alérgeno o que leva a liberação de substâncias denominadas “determinantes antigênicos” a partir do alérgeno envolvido, os quais são reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares (LT_{aux}) (Alberts et al., 2010).

Os LT_{aux} por sua vez, interagem com o macrófago e este, libera interleucina 1 (IL-1) o que acaba por estimular a multiplicação dos próprios LT_{aux} . Os LT_{aux} também interagem com linfócitos B, que em consequência, diferenciam-se em uma célula denominada plasmócito, com a capacidade para produzir a IgE específica para o determinado alérgeno (Alberts et al., 2010).

Como moduladores destes eventos, surgem dois tipos de leucócitos importantes: o linfócito T supressor (LT_{sup}) e o eosinófilo.

O LT_{sup} atua como uma célula que inibe as interações e transformações celulares antes mencionadas e presume-se que durante os processos alérgicos, a população de LT_{sup} estaria diminuída.

O eosinófilo atua como modulador das reações de hipersensibilidade, ao diminuir a resposta inflamatória, através da inibição de alguns mediadores pró-inflamatórios (histamina) e ao retirar, por fagocitose, complexos antígeno-anticorpo.

Apesar de toda a complexidade dos processos alérgicos, as células-chaves destas reações são os mastócitos (Brown & Roberts, 2011). Originados basicamente de precursores pluripotenciais da medula óssea e linfonodos, ganham a circulação como células imaturas, migram a partir daí para os tecidos característicos, onde amadurecem, residem e desenvolvem suas funções (Metcalf et al., 2006).

Estrategicamente os mastócitos permanecem na pele e mucosas do trato respiratório e gastrointestinal, no tecido conjuntivo frouxo, que envolve vasos e nervos, isoladamente na luz dos brônquios, além de fluido peritoneal de rato (Brown & Roberts, 2011).

Apesar de possuírem muitas características em comum, os mastócitos não representam uma população celular homogênea (Metcalf et al., 1997). Estas células diferem quanto à localização anatômica, quanto às características morfológicas, como tamanho e ultraestrutura dos grânulos citoplasmáticos, propriedades

imunohistoquímicas, além de exibirem diferenças funcionais em relação à sensibilidade a estímulos secretores e susceptibilidade à drogas (Marone et al., 1997).

Mediante a estas diferenças fenotípicas, os mastócitos acabaram por receber uma classificação mais tradicional que os agrupa em subtipos de acordo com o tipo de proteases presentes em seus grânulos. Assim há os mastócitos que contém apenas triptase (M_T), presentes em mucosas como mucosa intestinal e bronquial. E os mastócitos que contém tanto triptase quanto quimase (M_{CT}), encontrados predominantemente em tecido conjuntivo, por exemplo a camada dérmica da pele (Church & Levi-Schaffer, 1997; Paine & Kam, 2004).

Independente do tipo, quando ativados, os mastócitos sofrem o fenômeno de degranulação ou secreção de mastócitos. A degranulação consiste na liberação para o meio extracelular de histamina e outros mediadores pré-formados contidos em grânulos citoplasmáticos (Quadro1).

Há, entretanto outros tipos mediadores neoformados, que são derivados de lípidios da membrana celular (prostaglandinas e leucotrienos) e um terceiro grupo de substâncias liberadas também neoformadas, as interleucinas e citocinas quimiotáticas as quais possuem síntese lenta e são liberadas ao longo do processo de degranulação (Kalesnikoffand e Galli, 2008) (Quadro 1).

Os mediadores inflamatórios liberados são classificados como primários e secundários e, uma vez liberados produzem ações sobre os diferentes órgãos denominados “órgãos de choque” ou “órgão-alvo.

Quadro 1: Mediadores bioquímicos liberados de mastócitos.

Mediadores Primários	Mediadores Secundários
Histamina vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, broncoconstrição e aumento da secreção mucosa.	Leucotrienos $C_4 + D_4 + E_4$ = substância de reação lenta da anafilática (SRL-A)
Heparina = ação anticoagulante	Prostaglandina D_2 = ação vasodilatadora
Triptase = ação proteolítica, ativação de C3	Prostaglandina E_1 e E_2 = ação vasodilatadora e broncodilatadora
Cinogenase = produção de cininas, vasodilatadoras: bradicinina	Prostaglandina $F_{1\alpha}$ = ação broncoconstritora
FQA-A = fator de quimiotaxia dos eosinófilos	Prostaglandina I_2 = proteção vascular através de ação anti-agregante plaquetária
FQE-PMN = fator de quimiotaxia dos polimorfonucleares	Tromboxano A_2 e B_2 = atividade agregante plaquetária
FAP = fator de ativação das plaquetas	

Fonte: Adaptado de Gomes & de Oliveira, 2012

O fenômeno de degranulação pode se dar basicamente por dois mecanismos de ativação: imunológico e não imunológico. Embora do ponto de vista morfológico, o processo produzido pelos dois tipos de estímulos sejam similares, há variações nas sinalizações bioquímicas envolvidas, como veremos a seguir.

A estimulação imunológica, considerada não citotóxica, é a que define a reação de hipersensibilidade do tipo I. A estimulação ocorre através da interação de um antígeno multivalente, denominado alérgeno, com a IgE a qual se liga aos mastócitos o que ocasiona a liberação imediata de mediadores químicos, como a histamina, o mediador fortemente responsável pelas características clínicas da alergia.

Como parte da resposta alérgica a um antígeno, esses anticorpos são produzidos e se ligam a superfície da membrana celular de mastócitos através de receptores de alta afinidade (FcεRI), levando a ativação dos mastócitos através de uma típica reação antígeno-anticorpo. Ocasionalmente estas células podem ser ativadas também pela IgG através de expressão de receptores com afinidade para tal imunoglobulina (FcγRII) ou ainda por anafilotoxinas (Metcalf et al., 2006).

Em um primeiro momento, quando a IgE se liga ao receptor FcεRI, não ocorre secreção de mediadores; entretanto, os mastócitos ficam sensibilizados, ou seja, a IgE esta conjugada a eles. Em uma segunda exposição ao antígeno, este se liga a IgE conjugada e, então, o complexo Antígeno-Anticorpo-FcεRI (sendo uma molécula de antígeno para duas de IgE) ativa reações bioquímicas em cascata visando ao aumento de cálcio intracelular e ao despendimento de energia metabólica; isso, conseqüentemente, culmina com degranulação mastocitária (Gomes & de Oliveira, 2012).

Embora a sinalização molecular envolvendo o receptor FcεRI seja o mecanismo melhor compreendido na ativação de mastócitos há uma variedade de mecanismos adicionais envolvidos no evento, como a participação de receptores acoplados a família G, o envolvimento de proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPKs) e ativação de genes codificadores de citocinas e quimiocinas (Rivera et al., 2006).

Fatores não imunológicos tais como estímulos químicos, físicos ou extremos de temperatura e pH, envolvem diferentes interações com a membrana celular de mastócitos, podendo atuar na ativação celular tanto por mecanismos citotóxicos (lise celular) como por não citotóxicos (Galii.,1993).

A degranulação de mastócitos e, portanto a liberação de histamina por substancias químicas se dá em geral, aumentando a concentração de cálcio intracelular,

seja por tornar a membrana plasmática mais permeável ao cálcio externo ou por mobilizar cálcio de depósitos intracelulares (de Oliveira et al., 2011). O aumento da concentração interna de cálcio está relacionado com a ação de fosfolipases, proteína quinase C, calmodulina e adenilato ciclase que controla os níveis de AMPcíclico (Kim et al., 2005).

Entre os estímulos não imunológicos estão neuropeptídios, compostos básicos, componentes do complemento, e certos fármacos como a morfina, procaína e alguns antibióticos (Oskeritizian et al., 2005; de Oliveira et al., 2011). No entanto o composto 48/80, carreadores de cálcio e ionóforos são alguns dos mais potentes estimuladores de mastócitos que são usados para o estudo da resposta alérgica (de Oliveira et al., 2011).

Independente do tipo de estímulo inicial de degranulação, dentre os mediadores pró-inflamatórios liberados a partir dos mastócitos a histamina, é a mais bem caracterizada por ser tratar de uma amina vasoativa e espasmogênica, e por ter um papel importante nos eventos iniciais da inflamação, é considerada a grande responsável por algumas alterações observadas nas reações alérgicas agudas, sejam elas reações locais ou sistêmicas (Metcalf & Boyce, 2006).

Na dependência do tipo de alérgeno e da via de exposição a este, as alterações mais frequentes decorrentes destas ações são: prurido, urticária, edema bolhoso, conjuntivite, angioedema, rinite e sinusite alérgica, broncoespasmo, obstrução das vias aéreas, alterações digestivas e, além de todas estas, há o risco de desenvolvimento de choque anafilático (anafilaxia) que pode levar a óbito (Lee & Thomson, 2009).

A concentração de histamina nos tecidos corporais varia de forma considerável e acompanha a distribuição de mastócitos, os quais constituem o principal reservatório de histamina no organismo animal. (Gomes & de Oliveira, 2012). Assim sendo, tecidos e fluidos ricos em mastócitos como pele, camada mucosa do trato gastrointestinal e pulmões regiões que são expostas ao ambiente externo, além de fluido peritoneal de ratos e camundongos, possuem altas concentrações de histamina, além de ser encontrada no sangue, em basófilos circulantes (Gomes & de Oliveira, 2012).

Desta forma, os mastócitos estão estrategicamente dispostos como células primordiais nas defesas contra parasitas, microorganismos e agentes causadores de alergias. (Chang & Shiung, 2006).

A histamina é sintetizada a partir da descarboxilação de um aminoácido fornecido pela dieta, a L-histidina, e pela ação da enzima histidina descarboxilase, presente na maioria dos tecidos, formando em uma única etapa a histamina. Os

mastócitos representam o local predominante de síntese e o estoque de histamina na maioria dos tecidos, embora a síntese e estocagem ocorram também em neurônios (Brown & Roberts, 2010).

Uma vez liberada a partir dos mastócitos, a histamina exerce seus efeitos em tecido-alvo, seja nas reações alérgicas ou em eventos fisiológicos, por meio da interação com seus receptores localizados na superfície celular de diversos tecidos (Quadro 2). Existem, até o momento, quatro tipos de receptores histaminérgicos descritos, H1, H2, H3 e H4, todos pertencentes a família de receptores acoplados a proteína G (Quadro 3).

Quadro 2: Receptores e efeitos da histamina		
Local	Efeito	Via receptor
Vasos de menor calibre < 80 micras	Dilatação: rápida instalação e curta duração	H1
	Dilatação lenta e longa duração	H2
Vasos de maior calibre >80 micras	Constricção	H1
Vênulas pós-capilares	↑ Permeabilidade	H1
Coração	↑ Força de contração e ↑ frequência cardíaca	H2
	↓ Velocidade de condução do NAV (arritmias)	H1
Musculatura lisa brônquica	Broncoconstricção	H1
	Broncodilatação	H2
Musculatura lisa intestinal	Contração	H1
Terminações nervosas sensoriais	Dor e prurido	H1
	Estimulação de neurônios autônomos	
Sistema Nervoso Central	Inibição da síntese e liberação de histamina (receptor auto-inibitório)	H3
	Inibição da liberação neuronal de NA, Ach, 5-HT e dopamina	H3

Fonte: Gomes & de Oliveira, 2012.

Quadro 3. Receptores de histamina, localização e mecanismo de transdução		
Receptor	Localização	Mecanismo molecular
H1	Células endoteliais, musculares lisas e neurônios pós-sinápticos	Ativação da PLC: ↑ IP3 e DAG → PKC ↑ cálcio intracelular
H2	Células parietais da mucosa gástrica, miocárdio e neurônios pós-sinápticos	Ativação da AC: ↑ AMPc ↑ cálcio intracelular
H3	Neurônios histaminérgicos, colinérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos e dopaminérgicos pré-sinápticos no SNC	Inibição da AC e dos canais de cálcio: ↓ cálcio intracelular
H4	Mastócitos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas e células T	Mobilização de cálcio

Fonte: Gomes & de Oliveira, 2012.

Em relação à alergia, se a liberação de histamina ocorrer em pequenas quantidades ou lenta o suficiente para permitir sua inativação antes de atingir a circulação sistêmica, o resultado será uma reação alérgica localizada. Por outro lado, quando a reação é sistêmica, ocorre um quadro conhecido como anafilaxia ou choque anafilático, que pode ser fatal (Singh et al. 2012).

O amplo envolvimento da histamina nos sintomas observados nas desordens alérgicas levou naturalmente ao desenvolvimento de drogas antialérgicas, capazes de minimizar seus efeitos, os chamados antagonistas de receptores H₁.

Entretanto, dado o papel dos mastócitos nas alergias, através da secreção de histamina e os diferentes mediadores, a estabilização destas células e, portanto, inibição da liberação destas substâncias seria um fator primordial na prevenção e/ou controle das doenças alérgicas (de Oliveira et al.,2011).

Diferentes modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro* são utilizados para avaliar a atividade ou potencial antialérgico de fármacos, incluindo medicamentos fitoterápicos. Geralmente os modelos animais, são realizados em roedores previamente sensibilizados com um antígeno (por exemplo, ovoalbumina). Em seguida o animal recebe um alérgeno e as respostas patológicas são monitoradas através de detecção de anticorpos (IgE ou IgG), bem como os sinais e sintomas clínicos de reação alérgica (DeBrosse & Rotenberg., 2010).

Já em outros modelos não há sensibilização prévia do animal, e sim exposição direta ao agente alergênico ou mediador bioquímico, como por exemplo, é feito no modelo dede indução de broncoespasmo (*in vivo*) ou indução de contração de traquéia (*in vitro*) (Sagar & Sahoo, 2012). Ambos utilizados para checar a atividade antialérgica de fármacos através do antagonismo dos efeitos da histamina relacionados aos receptores H₁

Alguns modelos experimentais *in vivo* permitem a avaliação do efeito de fármacos sobre a degranulação de mastócitos, como por exemplo, a injeção local ou intraperitoneal de agentes secretores de mastócitos (composto 48/80) para indução de anafilaxia após o pré-tratamento com extratos de plantas com potencial antialérgico (Chandrasekhar et al.,2011). Neste modelo, a eficácia do agente teste é dada indiretamente através da determinação taxa de mortalidade dos animais (animais mortos/animais totais x 100) 1 hora após a administração do estímulo secretor (Chandrasekhar et al.,2011).

Outra forma de se estimar a eficácia de um fármaco como antialérgica pode se através da análise citológica em tecidos ricos em mastócitos, provenientes de animais submetidos a reações alérgicas (Singh et al., 2012). Neste modelo pode se inferir se um agente foi capaz de prevenir a degranulação de mastócitos através de uma taxa de granulação por contagem das células (mastócitos degranulados/mastócitos totais x100).

É possível medir o grau de degranulação de mastócitos pelo ensaio de liberação de β -hexosaminidase (proteína de marcador do grânulo) (Mortaz et al., 2005), porém o método geralmente utiliza mastócitos provenientes de cultura, o que exige condições mais delicadas de manejo celular.

Em todos os modelos experimentais citados previamente, não há nenhum que avalie a atividade inibidora que um fármaco pode exercer de forma direta sobre a secreção de mastócitos, isto é sem necessidade de cultura de células, e utilizando a histamina como marcador da degranulação, como o modelo de secreção de mastócitos (Shore et al., 1959; Siriganian et al., 1979) utilizado no presente estudo.

O modelo permite que seja feita a avaliação *in vitro* do efeito direto de uma substância, extrato de planta ou fármaco, sobre a secreção de mastócitos presentes em suspensão celular contendo mastócitos obtidos de diferentes fontes orgânicas, como já demonstrado por Gomes et al., (1996) utilizando mastócitos peritoneais de rato obtidos por lavagem direta da cavidade e mais recentemente de Oliveira et al. (2011) que utilizou mastócitos de tecido conjuntivo e de mucosa.

O modelo de secreção de mastócitos através da dosagem de histamina, já foi empregado na avaliação do potencial antialérgico de plantas medicinais (Gomes et al., 1994). Um estudo feito por de Oliveira et al. (2011) demonstrou que uma planta nativa brasileira utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, a *Cordia verbenacea*, conhecida como erva baleeira, foi capaz de inibir a liberação de histamina em mastócitos de diferentes origens orgânicas e em diferentes espécies animais roedores. O extrato (Sertié et al., 2005; Roldão et al., 2008), o óleo essencial (Passos et al., 2007) e os compostos isolados da *Cordia verbenacea*, foram avaliados também quanto à atividade anti-inflamatória (Fernandes et al., 2007; Medeiros et al., 2007) e antialérgica (Passos et al., 2007).

Estes estudos sustentam a base da origem de um fitoterápico genuinamente desenvolvido no Brasil, feito a partir de *Cordia verbenacea* (Pianowski, 2005).

Apesar destas premissas, a heterogeneidade dos mastócitos dificulta o desenvolvimento de novos agentes capazes de inibir as reações alérgicas de forma

ampla. Além do que, os fármacos inibidores da secreção de mastócitos apresentam diferenças quanto à eficácia (Mancel et al., 1999).

Em virtude destes fatores, cada vez mais vem se buscando substâncias com ação mais ampla e eficaz sobre a exocitose de mediadores mastocitários, sendo que um grande número de extratos e/ou substâncias naturais isoladas de plantas medicinais, tem sido identificados como possíveis candidatos a agentes inibidores da secreção de mastócitos (Chang & Shiung, 2006).

1.3 Uso de plantas medicinais na alergia e na região Amazônica

Algumas plantas tanto da flora brasileira como de outros países, com indicações da medicina popular para tratamento de quadros de inflamação, incluindo as manifestações alérgicas, já possuem identificação de seus constituintes químicos e confirmações de sua eficácia em diferentes modelos experimentais de alergia.

Entre elas podemos destacar a *Uncaria guianense* (unha de gato) (Carvalho et al.,2006), a *Schinus terebinthifolius* (aroeira-vermelha) (Cavaller-Machado, 2008), a *Cordia verbenacea* (erva baleeira) (de Oliveira et al., 2011), a *Maticaria recruta* a L. (camomila) (Chandrasekhar et al.,2011), a *Elephantopus scaber* (língua de vaca) (Sagar & Sahoo,2012) e a *Cassia alata* Linn (Senna) (Singh et al., 2012).

A planta língua de vaca referenciada na medicina popular para tratar eczemas na pele, demonstrou ter atividade anti-histamínica em modelo de traqueia isolada de cobaio (*Cavia porcellus*) (Sagar & Sahoo, 2012). Assim como o extrato etanólico de “unha de gato”, planta conhecida popularmente como “anti-inflamatória” e antialérgica” em regiões tropicais, também apresentou propriedades medicinais consistentes com a suas indicações etnofarmacológica ao inibir edema de pata e exsudação pleural em camundongos pré-tratados por via oral com o extrato (Carvalho et al.,2006).

O extrato metanólico da camomila, apresentou atividade anti-anafilática e antilérgica local provocadas por composto 48/80 em animais pré-tratados por via oral, além de estabilização de mastócitos (Chandrasekhar et al., 2011).

Uma planta conhecida como Senna (*Cassia alata*) foi capaz estabilizar mastócitos segundo o método de avaliação citológica (Singh et al., 2012).

A *Mikania glomerata* (guaco) tradicionalmente conhecida como planta antialérgica, também teve a propriedade comprovada ação exercer atividade broncodilatadora e em diminuir a contração provocada por histamina em traquéia de guinea pig (Soares et al., 2002).

Apesar desses estudos relatados, existe uma grande diversidade de plantas comumente usadas na região amazônica que ainda necessitam de estudos para justificar sua eficácia, bem como avaliar a possível toxicidade delas (Oliveira DPC et al., 2008).

Apesar desses estudos relatados, existe uma grande diversidade de plantas comumente usadas na região amazônica que ainda necessitam de estudos para justificar seu uso, bem como avaliar a possível toxicidade delas (Oliveira DPC et al., 2008). Além do que as espécies citadas em estudos anteriores nem sempre são avaliadas quanto a segurança de possíveis efeitos tóxicos e também sobre o controle de qualidade do material vegetal. Ao lado disso, algumas espécies também não chegam a torna-se fitoterápicos novos com propriedades anti-alérgicas.

Portanto a avaliação dos efeitos de candidatos a novos fitoterápicos com potencial para prevenção ou tratamento de alergias pode fornecer base para novas perspectivas na terapêutica das doenças alérgicas..

As plantas medicinais utilizadas neste estudo são de uso popular frequente na região e possuem diversas indicações etnomedicinais, sendo em comum entre elas a indicação para processos inflamatórios e o fato de até o momento não existir estudos que comprovem se há eficácia e segurança quanto ao uso (Quadro 4).

Quadro 4: Plantas medicinais selecionadas para este estudo com descrição das partes utilizadas e indicações etnomedicinais

NOME VERNÁCULO	NOME CIENTÍFICO	PARTES USADAS	USOS ETNOMEDICINAIS	FONTE
barbatimão do Pará	<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk)	casca, folha	Infecções geniturinárias, corrimento vaginal, “mãe-do-corpo”, cefaléia, sintomas relacionados a quadros alérgicos (tosse, congestão).	Coelho-Ferreira et al. 2009
cipó d’alho	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.)A.H. Gentry	folha	Repelente, hipertensão, reumatismo, doenças de pele, com sinais alérgicos como “impingens”, enjoos, gripe.	Sousa-Nascimento, 2012 Lameira & Pinto, 2008
açoita-cavalo	<i>Luhea speciosa</i> Willd	folha	Artrite, corrimento, reumatismo.	Veiga, 1992
noni	<i>Morinda citrifolia</i> Linn	fruto, folha	Artrite, diabetes, hipertensão, malária, melhora o sistema imunológico.	Serafini et al. 2011
pariri/crajirú	<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann sin. <i>Arrabidaea chica</i> (Bonpl.) Verl	folha	Anti-inflamatório, inflamações do estômago, rins e fígado, anemia, conjuntivite, diarreia, cólica intestinal, problemas de pele que incluem alergias, cicatrizante, cosmético.	Lameira & Pinto, 2008; Oliveira DPC et al., 2008; Coelho-Ferreira et al., 2009.

1.4 Aspectos botânicos, distribuição geográfica e etnofarmacologia das espécies das plantas usadas nesse estudo.

1.4.1 *Morinda citrifolia* Linn

ASPECTOS BOTÂNICOS

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliophyta

Ordem: Gentianales

Família: Rubiaceae

Gênero: *Morinda*

Espécie: *Morinda citrifolia*

Nome científico: *Morinda citrifolia* Linn



Figura 1: *Morinda citrifolia* L. Fonte: Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA

É uma árvore pequena ou arbusto de 3-10m de altura na maturidade com grandes folhas elípticas (Figura 1), com muitas frutas dispostas em nós ao longo dos ramos, caules finos e ramos. Os frutos, tecnicamente conhecidos como sincarpo. Concreção de vários frutos contíguos em desenvolvimento, dando uma infrutescência, como na jaca, no abacaxi, etc.) é branco-amarelado, carnoso, 5-10 cm de comprimento, cerca de 3-4 cm de diâmetro muito macio e fétido quando amadurecido Zapp (2013).

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As plantas do gênero *Morinda*, exclusivamente, estão distribuídas nas zonas tropicais do mundo, existem cerca de 80 espécies. A *Morinda citrifolia* Linn é natural do sudeste da Ásia, disseminou-se desde a Índia até o Norte da Austrália. Distribuiu-se, predominantemente, em regiões tropicais sendo que cerca da metade de suas espécies é de ocorrência neotropical, no Caribe e ao longo da costa da América central, mas a maioria é encontrada na América do Sul. No Brasil é mais comum a sua ocorrência em matas úmidas como a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica (Oliveira, 2009) (Figura2).



Figura 2: Distribuição geográfica de *Morinda citrifolia* Linn. Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

ETNOFARMACOLOGIA

A *Morinda citrifolia* já é utilizada como suco do fruto, há cerca de 2000 anos na polinésia contra vários tipos de doenças, tais como diabetes, febre, tuberculose, de afecções com possível envolvimento alérgico, tais como, artrite e desordens respiratórias (Serafins et al., 2011). Frente a estas indicações etnomedicinais, seu uso expandiu-se no mundo (Serafins et al., 2011).

Diversos estudos, há décadas relatam suas atividades terapêuticas, sendo alguns mais recentes citam ação antidiabética, (Lee et al., 2011), anti-neoplásica (Gupta et al., 2013),

antimicrobiana (Bhardwaj , et al., 2012), ação anti-inflamatória, antinociceptiva de frações do extrato da espécie sob o modelo de indução de inflamação por edema de pata induzido pela aplicação de formalina (teste de formalina), e potencial ação antagonista de histamina, uma vez que reduziu o edema de pata provocado pela administração subcutânea de histamina (Okusada et al. 2011).

O extrato das folhas de *Morinda citrifolia* Linn também apresentou potencial antioxidante quando testados sob peroxidação lípica, determinação de nitritos (Serafini et al., 2011);além de já ter alguns de seus compostos químicos identificados, compostos este sugestivos de exercer ação antioxidante (glicosídeos, compostos fenólicos e flavonoides) (Serafini et al., 2011; Zhang et al., 2013; Thoo et al.,2013).

1.4.2 *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann.

ASPECTOS BOTÂNICOS

- Reino: Plantae
- Divisão: Pteridophyta
- Classe: Equisetopsida
- Ordem: Lamiales
- Família: Bignoniaceae
- Gênero: *Fridericia*
- Espécie: *Fridericia chica*
- Nome científico: *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann; sin. *Arrabidaea chica* (Bonpl.) Verl.

Possui folhas compostas bi ou trifolioladas, folíolos oblongo-lanceolados, cartáceos, 8-13 cm de comprimento, flores campanuladas rósea-lilacinas, dispostas em panículas terminais, frutos tipo síliquas deiscentes (Figura 3).



Figura 3: *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann. Fonte: Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

É uma espécie nativa que ocorre em todas as regiões do Brasil (Figura 4)



Figura 4: Distribuição geográfica de *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann. Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

ETNOFARMACOLOGIA

A *Fridericia chica* já teve algumas propriedades medicinais comprovadas, como antifúngica (Barbosa et al., 2008) e anti-inflamatória frente a edema de pata em camundongos provocado por veneno de serpentes amazônicas. O estudo demonstrou que o extrato aquoso da *Fridericia chica* administrado por via intraperitoneal em foi capaz de inibir a miocitólise e migração celular. Sugerindo assim que a planta tem de fato potencial para a obtenção de princípios ativos anti-inflamatórios. (Oliveira DPC, et al., 2008).

ASPECTOS BOTÂNICOS

1.4.3 *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry

- Reino: Plantae
- Divisão: Tracheophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Lamiales
- Família: Bignoniaceae
- Gênero: *Mansoa*
- Espécie: *Mansoa alliacea*
- Nome científico: *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry

Caracteriza-se como um arbusto semi-trepador de 3m ou mais, partes vegetais com cheiro de alho. Ocorre em terra firme longe de corpos de água, áreas sombreadas tanto de capoeiras como bosques primários, e em zonas tropicais com precipitação pluvial, solo arenoso, areno-argiloso e argiloso com matéria orgânica. (Ferreira & Gonçalves, 2007)

São constituídas com folhas opostas e compostas, flores hermafroditas, zigomorfas, gamopétalas, oligostêmones, estames didínamos, epipétalos, com estaminódios presentes, gineceu si cárpico, ovário súpero, estilete bifido e fruto do tipo cápsula (Vilhena-Potiguara et al., 2012) (Figura 5).



Figura 5: *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry. Fonte: Horto de plantas Medicinais da EMBRAPA.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A *Mansoa alliacea* é de origem amazônica, mais especificamente da região norte (Amazonas e Pará) e nordeste (Maranhão) (Figura 6).



Figura 6: Distribuição geográfica de *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry. Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>.

ETNOFARMACOLOGIA

A *Mansoa alliacea* (cipó d'álho) tem suas folhas usadas na forma de chá no tratamento de tosse, enjoo, constipação e reumatismo, artrite (Souza Filho & Nascimento, 2012).

Recentemente uma publicação reuniu diversos experimentos que comprovam diferentes propriedades medicinais da planta, como anti-inflamatória, ansiolítica, entre outras (Souza Filho & Nascimento, 2012).

1.4.4 *Luehea speciosa* Willd

- Aspectos botânicos
- Reino: Plantae
- Divisão: Tracheophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Malvales
- Família: Malvaceae
- Gênero: *Luehea*
- Espécie: *Luehea speciosa*
- Nome científico: *Luehea speciosa* Willd.

A árvore mede de 6 a 30 m de altura possui tronco com 30 a 120 cm de diâmetro, com casca externa pardo-acinzentada, de até 25 mm de comprimento, com numerosos e pequenos sulcos longitudinais e, casca interna rosada até avermelhada, com textura fibrosa. Suas folhas são simples, alternas, dísticas, membranáceas a cartácea, oblongas, com estípulas, pecioladas (até um cm), com margens irregularmente serradas e base arredondada a sub-cordada, dicolores, verde-escuras, ásperas ao tato na face adaxial e com pilosidade branco-tomentosa na face abaxial, medem de 5 a 15 cm de comprimento por 2 a 6 cm de largura. As flores são brancas, hermafroditas, polistêmones e reunidas em inflorescências cimosas axilares ou em panículas terminais; podendo as flores chegar até 2,5cm de comprimento (Figura 7a. O fruto é uma cápsula de até 3 cm, coberta de pilosidade de cor castanha, deiscente por cinco fendas na extremidade (Marques, 2007)..



A.



B.

Figura 7: *Luehea speciosa* Willd. Fontes: A. Marques, 2007, B. Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As espécies do gênero *Luehea* crescem em Cuba, na América Central e do Sul, no Brasil ocorre em todas as regiões (Figura 8).



Figura8: Distribuição geográfica do gênero *Luehea* Willd no Brasil. Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

ETNOFARMACOLOGIA

Quanto a *Luehea speciosa* Willd, não há dados científicos que comprovem as propriedades medicinais indicadas pela população, mas há pesquisas realizadas com espécies do mesmo gênero, como *Luehea divaricata* onde se relata, por exemplo, estudos etnobotânico no Brasil, atividade antimicrobiana e potencial mutagênico (de Souza, 2004; Bieski et al., 2012; Felicio et al., 2011).

1.4.5 *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk).

ASPECTOS BOTÂNICOS

Reino: Plantae

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Ordem: Oxalidales Bercht. & J. Presl.

Família: Connaraceae R. Br.

Gênero: *Connarus*

Espécie: *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk)

É uma árvore que possui pecíolo de (2-) 5-12(16) cm e raque de (2-) 9-13 cm de comprimento. Folíolos de (2-) 4-17(23) cm de comprimento por (1-)2,7-5,5(-6) cm de largura, estreito-elípticas, rígido-cartáceos, ápice acuminado, acúmen de até 1,5 cm de distância, margem levemente revoluta e inervação reticulada. Pedicelo de 0,2 cm de comprimento; sépalas de 2,8-3,5 mm de comprimento, unidas em grupo; pétalas de 2,8-3,5mm de comprimento e 0,7-0,9 mm de largura, glabras ou pubérulos externamente; filamentos unidos a um mm, glabros ou com pelos glandulares; anteras globosas com ou sem pelos glandulares no ápice do conectivo. Fruto estipitado (estipe de até 0,4 cm de comprimento) de dois cm de comprimento por 1,7 cm de largura (Paracampo, 2011) (Figura 9).



Figura 9: *Conarus perrottetti* var. *angustifolius* Radlk. (Connaraceae). (a) Espécime do Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental, (b) tronco de casca, (c) folha, (d) folha jovem, (e) fruto, (f) inflorescência. Fonte: Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA, por Paracampo, 2011.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

É uma espécie nativa da Amazônia e endêmica do Brasil. É encontrada naturalmente crescendo em Floresta de Terra Firme (Paracampo, 2011).

Os domínios fitogeográficos são: a região Norte (Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia) e o Centro-Oeste (Mato Grosso), onde recebe os nomes populares de marassacaca ou muraçacaca no Pará, pajurarana ou pajujurana no Mato Grosso e raparigeira no Amapá (Forero; Kamino, 2010) (Figura 10).



Figura 10: Distribuição geográfica de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*(Radlk).Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

ETNOFARMACOLOGIA

As pesquisas sobre os efeitos da *Connarus perrottetii* ainda são escassas, principalmente na farmacologia. Embora a importância do seu uso tradicional como barbatimão no Pará tenha sido confirmada (Paracampo, 2011).

Em estudo etnobotânico realizado em Marudá, PA, a utilização da casca de barbatimão (*Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) foi citada para o tratamento de: infecções geniturinárias em mulheres, hemorragia uterina, ovários císticos, corrimento vaginal, "mãe-do-corpo", doenças gástricas, cefaléias, gripe, tosse e congestão. Esses efeitos curativos foram obtidos com diferentes formas de administração: maceração, chá, "garrafada", banho ou xarope (Coelho-Ferreira, 2009). Também foi destacada a elevada importância cultural dessa espécie de barbatimão em Algodual, PA, citado por mais de 50% dos entrevistados em um inventário etnobotânico realizado na área (Roman & Santos, 2006).

1.5 Potencial genotóxico das plantas medicinais

Salienta-se ainda que pelo fácil acesso, o uso dessas espécies é muitas vezes indiscriminado, e torna cada vez mais crescente sua comercialização, até mesmo pela questão das políticas públicas estimuladoras do uso de fitoterápicos.

Deste modo, se faz necessário avaliar não apenas a questão das propriedades curativas das plantas, mas o potencial tóxico, especialmente o de caráter aguda, com o uso em curto período de tempo juntamente com a avaliação de possíveis danos genético devido às graves consequências que podem ocorrer em longo prazo, tais como o desenvolvimento de câncer, alterações reprodutivas e anomalias genéticas.

Entre as plantas aqui selecionadas, a *Morinda citrifolia* Linn, mais especificamente o extrato obtido do fruto, demonstrou apresentar potencial de causar dano genético em celular renais de ratos (Alencar et al.; 2013), porém há necessidades de mais estudos.

Recentemente foi investigado os possíveis efeitos os efeitos mutagênicos e genotóxico de uma fração oriunda do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot (pariri) e concluiu que este não causa dano genético nas concentrações e modelo testado(dos Santos et al., 2013).

Para a maior parte das plantas selecionadas até o momento não há dados a respeito de sua genotoxicidade em humanos, apesar dos relatos de uso popular medicinal.

A genotoxicidade estuda os processos que causam alteração no DNA. Esta alteração pode acontecer na estrutura físico-química do DNA (processo este classificado de mutagênese) ou no determinismo genético ao nível celular ou orgânico (processos identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese) (Silva *et al.*, 2003).

É possível identificar atividade genotóxica *in vitro* de alguns compostos, através de testes criptogenético.

O Guia da *Quarta Conferência Internacional Sobre a Harmonização - The Fourth International Conference on Harmonization (ICH) Guidelines* (2011)- descreve uma bateria padrão de testes genotóxicos para fármacos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

No caso dos testes *in vitro* para avaliação de danos citogenéticos nas espécies mamíferas, segundo o referido Guia, a avaliação de micronúcleos e a técnica de determinação de aberrações cromossômicas são considerados padrão.

O guia indica ainda, entre métodos, o uso de culturas de linfócitos humanos periféricos, células de ovário e pulmão de hamsters chinês, sendo a cultura de linfócitos humanos periféricos frequentemente utilizados para o diagnóstico citogenético (Gus, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar uma triagem de cinco espécies de plantas medicinais usadas na Amazônia através da análise de secreção de histamina.

2.2 Específicos

- Obter extratos etanólicos brutos de:
 - *Morinda citrifolia* Linn (noni)
 - *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohman (pariri ou crajirú)
 - *Mansoa aliacea* (Lam.) A.H. Gentry (cipód´alho)
 - *Luehea speciosa* Willd (açoita-cavalo)
 - *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (barbatimão do Pará)

- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos obtidos.

- Avaliar a atividade *in vitro* desses extratos sobre a secreção de histamina de mastócitos peritoneais de rato, considerando o efeito direto sobre a secreção espontânea e sobre a secreção induzida por ionóforo A23187 e composto 48/80.

- Selecionar o extrato de melhor atividade inibitória da secreção de histamina e realizar análises toxicológicas:
 - Toxicidade aguda
 - Genotoxicidade em cultura primária de linfócitos humanos expostos através de técnica de determinação de aberrações cromossômicas

- Fracionar o extrato selecionado e determinar o perfil fitoquímico das frações obtidas por cromatografia de camada delgada.

- Avaliar a atividade *in vitro* das frações sobre a secreção de histamina de mastócitos peritoneais de rato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

3.1.1 Colheita

As plantas foram coletadas no horto de plantas medicinais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA/Amazônia Oriental no município de Belém (Estado do Pará) na região amazônica localizado a 1°27'21''S e 48°30'14''W, com altitude de 10m do nível do mar. O horto de plantas medicinais da referida instituição é credenciado ao Conselho de Gestão de Patrimônio Genético-CCGEN/IBAMA sob o nº 034/10.

O material vegetal foi coletado as 9:00h, pelos coletores Déborah Mara Costa de Oliveira e Silvio Damasceno, no mês de outubro de 2012, e em seguida as amostras foram armazenado em sacos plásticos para evitar desidratação durante o transporte, para o Laboratório de Agroindústria da referida instituição, onde foi processado para obtenção dos extratos. As espécies estavam em fase adulta estágio reprodutivo.

Amostras representativas de cada espécie (parte vegetativa + reprodutiva) foram selecionadas para preparação de exsiccatas.

3.1.2 Identificação

O material vegetal fértil foi identificado e autenticado pela especialista Dr^a. Silvana Tavares Rodrigues pesquisadora responsável pelo laboratório de botânica-herbário da EMBRAPA-Amazônia Oriental, onde as plantas foram depositadas sob os números apresentados no quadro 5.

Quadro5: Identificação das plantas medicinais usadas no presente estudo.

NOMES VERNÁCULOS	NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA	Nº DA EXSICATA
barbatimão do Pará	<i>Connarus perrottetii var. angustifolius</i> (Radlk)	Connaraceae	IAN184393
cipó d'alho	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	Bignoniaceae	IAN 184394
açoita cavalo	<i>Luehea speciosa</i> Willd.	Malvaceae	IAN 188658
Noni	<i>Morinda citrifolia</i> Linn	Rubiaceae	IAN 188659
pariri	<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann	Bignoniaceae	IAN 188177

3.1.3 Obtenção dos extratos

As folhas, casca ou fruto foram separados das demais partes da planta e secos em estufa com circulação e renovação de ar forçado à 45⁰C durante 120 horas.

Para cálculo de rendimento das amostras (peso seco/peso úmido =rendimento em porcentagem), o material coletado foi pesado antes e após a desidratação.

Além do cálculo de rendimento das amostras, amostras dos extratos foram submetidos a determinação do teor de umidade residual, pelo método (Farmacopéia Brasileira,1988), com pesagem em balança acoplada a sistema de irradiação infra-vermelha.

Após secagem, as folhas, cascas ou frutos, foram pulverizados em moinho de facas.

Todo o material foi pesado e acondicionado em frascos de vidro individuais e então, submetido à extração sob refluxo por uma hora em banho-maria a 80⁰C, utilizando-se como agente extrator etanol 70%.

Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo. Após a filtração, os resíduos das plantas foram submetidos novamente a mais duas extrações e filtrações como descrito acima, até obter esgotamento do material vegetal.

O filtrado total de todas as extrações de cada amostra de planta foi transferido para um balão de fundo redondo e submetido à concentração com auxílio de evaporador rotativo à temperatura não superior 45 ⁰C, até cerca de 10% do volume original, obtendo-se assim o extrato hidroetanólico de cada planta com suas respectivas partes.

Após o cálculo do rendimento [peso do balão - peso do balão contendo extrato concentrado = rendimento], os extratos concentrados foram liofilizados (Freezone 2.5/Labconco®) e armazenados (-18⁰C) até o momento do uso.

Para a realização da prospecção fitoquímica e dos ensaios biológicos, todos os liofilizados foram dissolvidos a concentrações stocks de 100µg/mL com solução Tyrode contendo 0,2% de DMSO (pH = 7,3), após terem sido testados outros veículos (água destilada e solução salina NaCl a 0,9%).

3.2 Análise fitoquímica

3.2.1 Prospecção fitoquímica qualitativa

Com o objetivo de detectar as classes de constituintes químicos presentes nas partes da planta usadas foi realizada a investigação fitoquímica como descrito por Matos (1987) e adaptado por Gonzáles & Di Stasi (2002). Ainda, foram realizadas análises quantitativas de compostos fenólicos, devido a estes possuírem potencial atividade anti-inflamatória ou inibidora da secreção de histamina.

3.2.2 Doseamento de compostos fenólicos totais

O doseamento de compostos fenólicos totais nos extratos vegetais foi realizado empregando-se o método com o reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton e Lamuela-Raventó; 1999). O reagente é constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico. Nesta solução o molibdênio e o tungstênio encontram-se em estado de oxidação 6+. Na presença de certos agentes redutores, como substâncias fenólicas, o estado de oxidação média destes metais fica entre 5-6, adquirindo coloração azul, que pode ser monitorada em 750 nm.

Soluções hidro alcoólicas (metanol 70%) dos extratos foram preparadas nas concentrações de 0–1000 µg/mL. Em cada cavidade da microplaca foi adicionado 50 µL de água, 25 µL das amostras-testes, 25 µL do reagente Folin (2N, Sigma) e as misturas reacionais serão mantidas ao abrigo da luz por 5 minutos. Decorrido o período de incubação, foi adicionado 125 µL de Na₂CO₃ 7% e realizada uma incubação adicional de 1 h ao abrigo da luz. Em seguida, as medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 750 nm. O composto ácido gálico (Sigma) foi usado como controle (0–400 µg/mL). O teor de fenóis totais foi expresso como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato, segundo a equação.

$$FT = \frac{[F] \times 1000}{[A]}$$

Onde:

FT: teor de fenóis totais

[F]: concentração de fenóis da amostra-teste ($\mu\text{g/mL}$), obtida pela leitura da absorbância da amostra e posterior interpolação da [] pela curva padrão

[A]: concentração da amostra-teste ($\mu\text{g/mL}$)

3.3 Fracionamento dos extratos

O extrato que apresentou melhor atividade inibidora da secreção de histamina foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e água) (Simões et al., 2010), partindo de 1 g de extrato liofilizado diluído em 100ml de solução aquosa de extrato por 100mL de solvente. Isso resultou na separação provável dos principais metabólitos secundários.

As frações obtidas com polaridades distintas foram chamadas respectivamente de FrHex, FrAcEta e FAq e foram submetidas à análise por determinação do perfil cromatográfica, através da técnica de cromatográfica de camada delgada ..

3.3.1 Rendimento das frações

Os rendimentos das frações foram obtidos em relação à massa de extrato etanólico bruto utilizado para o procedimento de particionamento.

3.4 Cromatografia de camada delgada

O perfil cromatográfico das frações foi determinado de acordo com a técnica clássica de cromatografia de camada delgada (Lopes, 1990; Wagner & Blatt, 1995; Ferri, 1996).

3.5 Dosagem de histamina

3.5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (200 e 250g), de 3 meses de idade, mantidos sob condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade, com livre acesso à água e alimentação até o momento da realização do procedimento experimental.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu/SP (n° 42/04-CEEA).

3.5.2 Obtenção das suspensões celulares contendo mastócitos

Os animais foram previamente submetidos a anestesia com associação de xilazina (20mg/Kg) e cetamina (100mg/Kg) ambos administrados por via intraperitoneal e logo que estabelecida o plano anestésico (aproximadamente 10 minutos após) os animais foram mortos por decapitação.

Após a morte dos animais, a suspensão celular contendo mastócitos peritoneais foi obtida por lavagem direta da cavidade peritoneal utilizando-se solução de Tyrode contendo heparina (5unidades/mL). Em seguida, foi filtrada em gaze dupla umedecida com solução de Tyrode. As células foram recuperadas por centrifugação (22°C, 1000 rpm, 5 minutos) e lavadas duas vezes em 12 mL de solução de Tyrode. Posteriormente, as células foram ressuspensas em volume necessário para a realização do protocolo experimental (Gomes et al., 1994).

3.5.3 Exposição das suspensões celulares às soluções dos extratos.

O volume final de suspensão celular obtido foi pré-incubado à 37°C por 5 minutos, para a uniformização da temperatura, e dividido em tubos de ensaio em alíquotas de 0,5 mL para cada amostra experimental. Em cada amostra, foi adicionado o extrato teste e/ou outras

soluções, com exceção de duas amostras reservadas para a dosagem da liberação espontânea de histamina, utilizada como controle, e uma amostra para a dosagem de histamina total.

Após o período de estabilização, as suspensões de mastócitos foram em seguida incubadas durante 10 min a 37 C ° com os extratos nas diferentes concentrações (0 a 100 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,2%). Posteriormente, foram adicionados os agentes secretores, composto 48/80 (0,5 µg/ mL) ou ionóforo A23187 (3 µM). Depois de 10 minutos de reação, a secreção foi interrompida com solução de Tyrode gelada.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4°C, 1000 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante (que contém histamina fora dos mastócitos) foi separado do precipitado (que contém histamina dentro dos mastócitos) por decantação. A este último, foram adicionados 1,5 mL de solução de Tyrode. Finalmente, todas as amostras, precipitado e sobrenadante, receberam ácido perclórico (concentração final 0,4N) para precipitação de proteínas.

3.5.4 Extração e dosagem automática de histamina

Para dosagem e extração automática de histamina foi utilizado o método fluorimétrico de Shore et al. (1959), realizado através de um sistema de fluxo contínuo modular automático (Sirigianian, 1974).

Os precipitados e sobrenadantes obtidos no ponto anterior foram tratados por separado da mesma forma (no cálculo final, são consideradas ambas as medidas de precipitado e sobrenadante para o cálculo da liberação de histamina). Brevemente, os precipitados e sobrenadantes obtidos no ponto anterior contendo histamina, foram submetidas à extração butanólica após a adição de NaOH 2N saturado com NaCl, formando duas fases: aquosa e orgânica. A fase orgânica foi tratada de novo com NaOH 0,1N saturado com NaCl, formando novamente uma fase aquosa e outra orgânica. Esta última sofreu uma nova extração com HCl 0,1N. Após essa extração a fase orgânica foi desprezada, ficando a histamina extraída na fase aquosa ácida. Em seguida, a histamina extraída foi derivatizada com orto-ftaldialdeído (OPT) em solução fortemente alcalina. O resultado foi um produto condensado altamente fluorescente, estabilizado por acidificação com HCl 3N.

A intensidade de fluorescência foi registrada em registrador gráfico potenciômetro acoplado ao sistema de extração. O comprimento dos picos registrados foram então medidos em milímetros e essas medidas usadas para o cálculo de porcentagens de histamina liberada.

Os resultados foram expressos em porcentagem média de liberação de histamina (% LH) em relação ao total de histamina liberada:

$$\% \text{ LH} = S * 100 / T$$

S= comprimento do pico do sobrenadante

P= comprimento do pico do precipitado

T= soma dos comprimentos dos picos (S+P)

Todos os resultados foram apresentados descontando-se a histamina liberada espontaneamente.

Para os extratos que apresentaram a melhor eficácia sobre a diminuição da liberação de histamina, foi dado o seguimento nos experimentos com a triagem da análise toxicológica aguda e detecção do potencial genotóxico.

3.6 Avaliação da toxicidade aguda

3.6.1 Animais

Foram utilizados camundongos swiss, fêmeas, entre 8 a 12 semanas, com peso de 25 a 35g. Os animais foram mantidos em condições adequadas de temperatura, com ciclo claro-escuro de 12h/12h. Todos os animais foram provenientes do biotério central da UFPA.

3.6.2 Teste de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda para verificação de morte e sintomas provocados pela administração de xenobióticos foi realizado segundo o guia (OECD 425).

Foram utilizados 5 animais por grupo experimental. Os grupos foram divididos em grupo tratado com extrato teste e grupo controle que recebeu água destilada.

Após horas 6 horas de jejum para alimentos sólidos, os animais receberam 2000mg/Kg do extrato teste ou água destilada por via oral (gavagem) e em seguida foram avaliados aos 30min, 1, 2, 4, 24 e 48 horas após administração do extrato.

3.7 Avaliação do potencial Genotóxico

3.7.1 Obtenção da cultura de linfócitos humanos

a. Doadores Voluntários

Os linfócitos para as culturas foram obtidos a partir da coleta de sangue total de 6 doadores voluntários oriundos da cidade de Belém.

b. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão para todos os participantes neste estudo foram indivíduos adultos (≥ 18 e ≤ 40 anos de idade) de ambos os sexos.

c. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para todos os participantes foram: fumantes de mais de quatro cigarros ao dia, ser portador de doenças aguda e crônica graves, que estivessem em tratamento à base de medicamentos nos últimos dois meses, que fizessem uso de fármacos-dependentes, indivíduos que bebessem quantidades significativas de álcool (mais de 200 mL) ao dia, exposição ocupacional e outras atividades que produzam genotoxicidade, além de estar em trânsito pela cidade.

d. Aspectos éticos

Todos os participantes da pesquisa foram informados sobre o objetivo do estudo e solicitados seu consentimento por escrito para participar da pesquisa.

e. Coleta de amostras de sangue

De cada indivíduo foram colhidos 5 mL de sangue venoso com material estéril e de uso único que foi aberto pela primeira vez diante do participante. As amostras foram colocadas em tubos *vacutainer* heparinizados e a cultura foi realizada imediatamente após a coleta.

f. Cultura de linfócitos

Para obtenção das culturas de linfócitos humanos foi seguido o método descrito por Moorhead et al. (1960). Resumidamente, aos tubos de vidro contendo 5mL do meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico/antimicótico, 20% de soro fetal bovino inativado e 1,5% de fitohemaglutinina foram adicionados 500 µL de sangue total. Os tubos foram fechados e finalmente, as culturas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 72 horas.

Todo este procedimento foi realizado em um fluxo laminar, para evitar qualquer tipo de contaminação.

3.7.2 Técnica de determinação de aberrações cromossômicas (AC):

Após 48h do início das culturas de linfócitos humanos, foi adicionado o extrato na concentração final de 100 µg/ml, sendo esta a maior concentração utilizada nos ensaios biológicos sobre a secreção de histamina, descritos anteriormente. As células ficaram incubadas a 37°C por 24 horas. Duas horas antes do término da cultura foram adicionados 50 µL de colchicina (16 µg/mL), um inibidor de fuso mitótico, a fim de parar a divisão celular em metáfase (Srám et al., 1998; Lazutka et al., 1999).

Completadas às 72h de cultivo, as células foram coletadas por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm à temperatura ambiente). Posteriormente, foram descartados 4mL do sobrenadante deixando o pellet com 1mL de sobrenadante, que foi homogeneizado e tratado com uma solução hipotônica de KCl 0,075M durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram de novo centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente.

Assim, foram realizadas três fixações consecutivas da seguinte forma: o pellet com 1 mL do sobrenadante foi homogeneizado e acrescentado de 5mL dos fixadores metanol e ácido acético (3:1) e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente (Lee et al., 1999).

Após as fixações, as células dos cultivos foram depositadas sobre lâminas limpas e secadas a temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% durante 5 minutos. Todas as lâminas foram observadas em microscópio óptico e para determinação de AC (quebras cromossômicas, *gaps*, deformações...) foram analisadas 100 metáfases por indivíduo e calculado o Índice Mitótico (nº de metáfases encontradas a cada 1000 células).

3.8 Análise estatística

Para comparação dos resultados obtidos, foi realizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste pós-teste de comparações múltiplas Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando a probabilidade de erro foi menor do que 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Rendimento das amostras das plantas

Os rendimentos das amostras de planta, após o processo de secagem, são apresentados na Quadro 6.

Quadro 6: Rendimento das amostras				
PLANTA	PARTE DO VEGETAL	MATERIAL FRESCO	MATERIAL SECO	RENDIMENTO DAS AMOSTRAS (%) (MATERIAL SECO/MATERIAL FRESCO)
<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (barbatimão do Pará)	folha	460g	260g	56,5%
<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (barbatimão do Pará)	casca	700g	463g	66,1%
<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry (cipó d´alho)	folha	690g	260g	37,6%
<i>Luehea speciosa</i> Willd (açoita cavalo)	folha	700g	300g	42,8%
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (noni)	fruto	1.200g	108g	9%
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (noni)	folha	1000g	205g	20,5%
<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann (pariri)	folha	600g	143g	23,8%

4.2 Rendimento dos extratos concentrados

Os rendimentos dos extratos já concentrados são demonstrados na quadro7.

Quadro 7: Rendimento dos extratos concentrados				
PLANTA	PARTE USADA	MATERIAL SECO	MATERIAL CONCENTRADO	RENDIMENTO DOS EXTRATOS
<i>Conarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (barbatimão do Pará)	folha	260g	24g	9,2%
<i>Conarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (barbatimão do Pará)	casca	463g	18g	3,8%
<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry (cipó d'álho)	folha	260g	25g	9,6%
<i>Luehea speciosa</i> Willd (açoita cavalo)	folha	300g	27g	9%
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (noni)	fruto	108g	25g	23,1%
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (noni)	folha	205g	28g	13,6%
<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann (Pariri)	folha	143g	27g	18,8%

4.3 Teor de umidade dos extratos

O teor de umidade residual dos extratos são demonstrados no quadro 8

Quadro 8: teor de umidade residual dos extratos		
PLANTA	PARTE USADA	Umidade %
<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (barbatimão do Pará)	folha	5,8
<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (barbatimão do Pará)	casca	5,9
<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry (cipó d'alho)	folha	6,5
<i>Luehea speciosa</i> Willd (açoita cavalo)	folha	7,3
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (Noni)	fruto	6,7
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (noni)	folha	8
<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann (pariri)	folha	5,8

4.4 Perfil Fitoquímico

4.4.1 Prospecção fitoquímica qualitativa

Os resultados da análise fitoquímica qualitativa (Tabela 9) indicam a presença de substâncias químicas com propriedades anti-inflamatórias dos quais incluem os compostos fenólicos taninos (presentes em todos os extratos), catequinas e terpenóides (nos extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) (casca e folha), *Luehea speciosa* Willd e *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann) e compostos terpenóides (em *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann e no extrato dos frutos de *Morinda citrifolia* Linn).

Além disso, no extrato da casca de *Connarus perrottetii*, existe a presença de flavonoides, conhecido grupo de substâncias com capacidade antialérgica e anti-inflamatória, entre outras ações biológicas benéficas (Quadro 9).

Quadro 9: Prospecção fitoquímica dos extratos de *Connarus perrottetii*, *Luehea speciosa*, *Mansoa alliacea*, *Fridericia chica* e *Morinda citrifolia*. Cor amarela= presença da substância referida; Cor branca ou cinza = ausência de substância referida.

Nome científico	<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i>		<i>Luehea speciosa</i> Willd	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	<i>Fridericia</i> <i>chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann	<i>Morinda citrifolia</i> Linn	
Nome comum	barbatimão-do-Pará		açoita-cavalo	cipó-de-alho	pariri/ crajirú	noni	
Órgão da planta	casca	folha	folha	folha	folha	Fruto	Folha
Testes químicos							
Ácidos Orgânicos							
Açúcares redutores							
Polissacarídeos							
Proteínas e aminoácidos							
Taninos							
Catequinas							
Flavonóides							
Glicosídeos cardíacos							
Sesquiterpelactonas							
Azulenos							
Carotenoides							
Esteroides e triterpenóides							
Depsídeos e depsídonas							
Derivados da cumarina							
Saponina espumídica							
Alcalóides							
Purinas							
Antraquinonas							
Heterosídeos cianogénicos							

4.4.2 Dosagem de compostos fenólicos totais

Para a quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada uma curva de concentração com o padrão de absorvância do ácido gálico, com um coeficiente de correlação de 0,9997 (Figura 11). Portanto o método demonstrou confiabilidade para dosar os compostos fenólicos nos extratos.

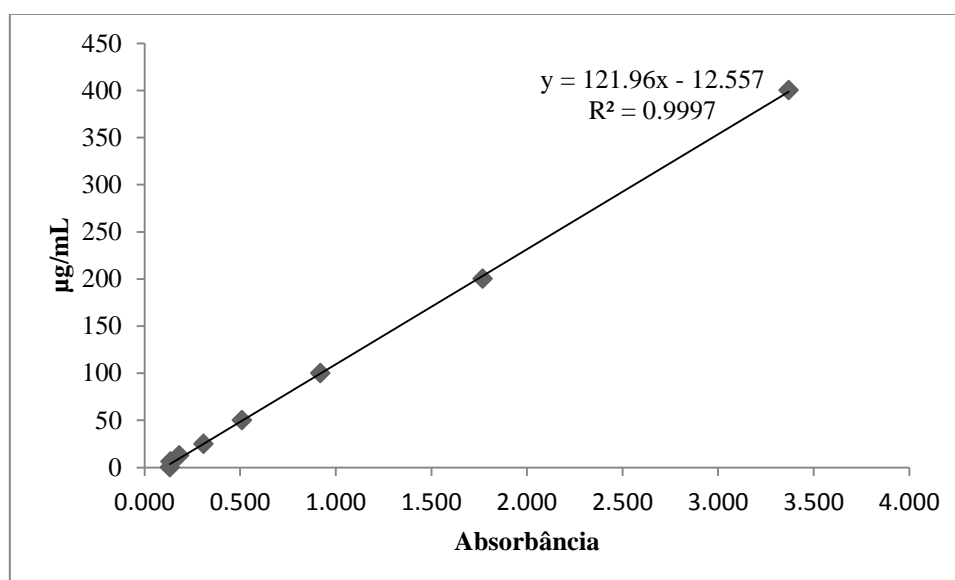


Figura 11: Curva de calibração com substância padrão (ácido gálico), os valores considerados padrão para a presença de compostos fenólicos é de 0 a 400 µg/mL .

Entre os extratos das plantas avaliados, os de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) foram o que apresentaram o maior quantidade de compostos fenólicos, tanto o da casca (391,65 mg EAG/g) como o da folha (411,21 mg EAG/g) (Quadro 10).

Quadro 10: Quantidade de composto fenólicos presentes nos extratos

Extrato avaliado/Parte utilizada	Teor de fenóis totais (mg EAG/g extrato seco)
<i>Morinda citrifolia</i> Linn /frutos	13,73
<i>Morinda citrifolia</i> Linn/folhas	30,56
<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) /cascas	391,65
<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> (Radlk) /folhas	411,21
<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann/folhas	134,77
<i>Luehea speciosa</i> Willd/folhas	246,38
<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry/folhas	57,69

4.5 Dosagem de histamina

4.5.1 Efeito do veículo (dimetilsulfóxido - DMSO) sobre a secreção espontânea de histamina de mastócitos peritoneais de rato.

Antes da realização dos ensaios de dosagem de histamina utilizando os extratos, foram testados como possíveis veículos, água destilada, solução salina (Na Cl 0,9%) e DMSO, sendo este último o que apresentou eficiência mais ampla na solubilização dos extratos.

O veículo utilizado então foi DMSO 0,2% em solução de Tyrode (v/v) para todos os extratos. Esse veículo não interferiu com a liberação de histamina (Figura 12).

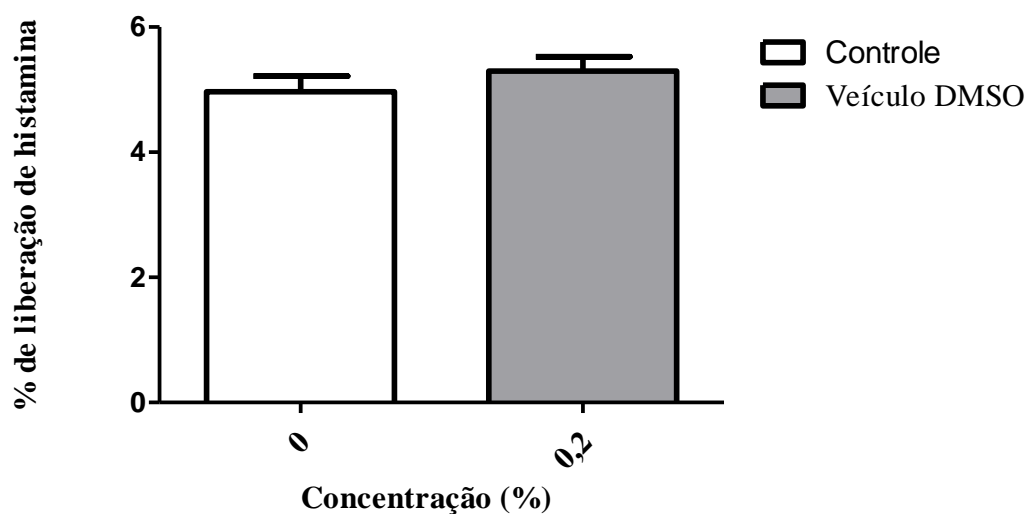


Figura 12: Efeito do veículo DMSO sobre a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato (n =4). $P > 0,05$ versus controle.

4.5.2 Efeito dos extratos de *Morinda citrifolia* Linn sobre a liberação de histamina.

a) Extrato dos frutos

O extrato dos frutos de *Morinda citrifolia* Linn não interferiu com a liberação espontânea de histamina e inibiu a liberação de histamina induzida por composto 48/80 nas concentrações de 0,3 e 3 $\mu\text{g/mL}$, e por ionóforo A23187 apenas na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13).

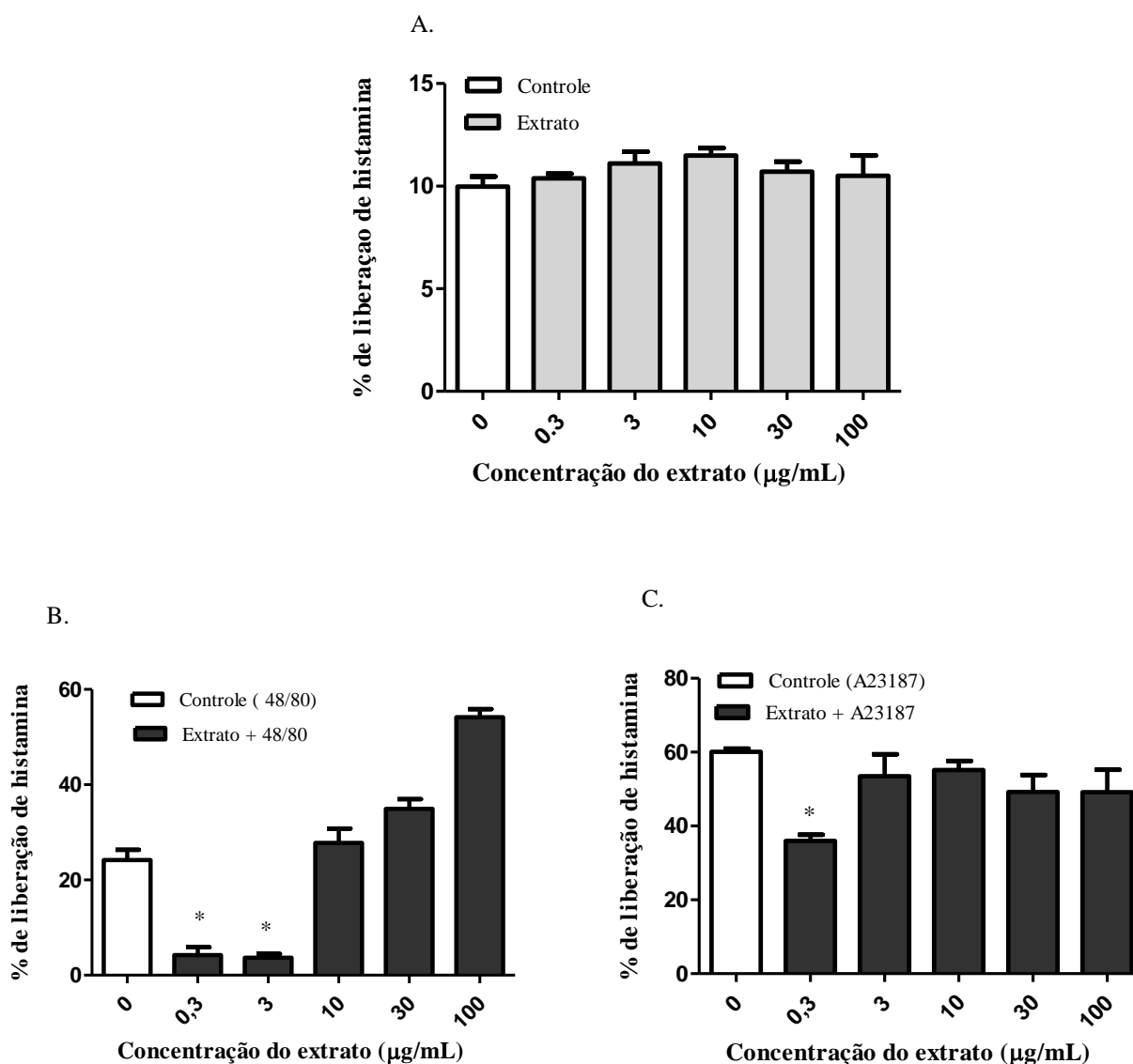


Figura 13: Efeito do extrato etanólico de frutos de *Morinda citrifolia* L. sobre a liberação espontânea de histamina (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3 μM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P < 0,05 versus controle.

b) Extrato das folhas

O extrato de folhas de *Morinda citrifolia* Linn não interferiu com a liberação espontânea de histamina e não apresentou efeito inibidor da liberação de histamina induzida por nenhum dos agentes secretores utilizados (Figura 14).

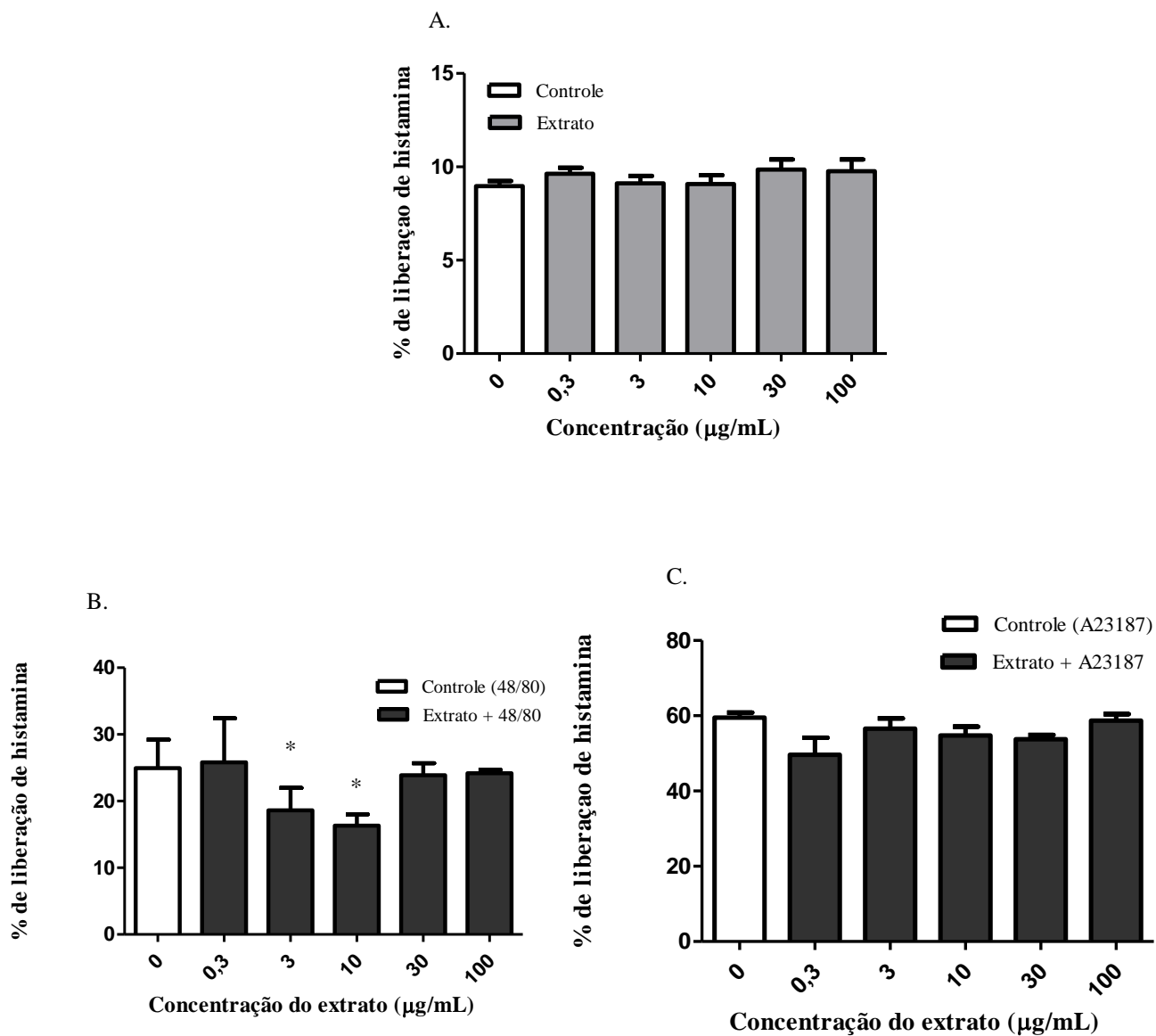


Figura 14: Efeito do extrato etanólico folhas de *Morinda citrifolia* Linn sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5µg/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3µM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P> 0,05.

4.5.3 Efeito do extrato de folhas de *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann sobre a liberação de histamina.

O extrato de *Fridericia chica* interferiu com a liberação espontânea de histamina apenas nas maiores concentrações (Figura 15A) assim como na presença de ionóforo A23187 (Figura 15C). Entretanto, ele foi capaz de inibir a liberação de histamina estimulada por composto 48/80 nas mesmas concentrações (30 e 100 μ g/mL) (Figura 15B).

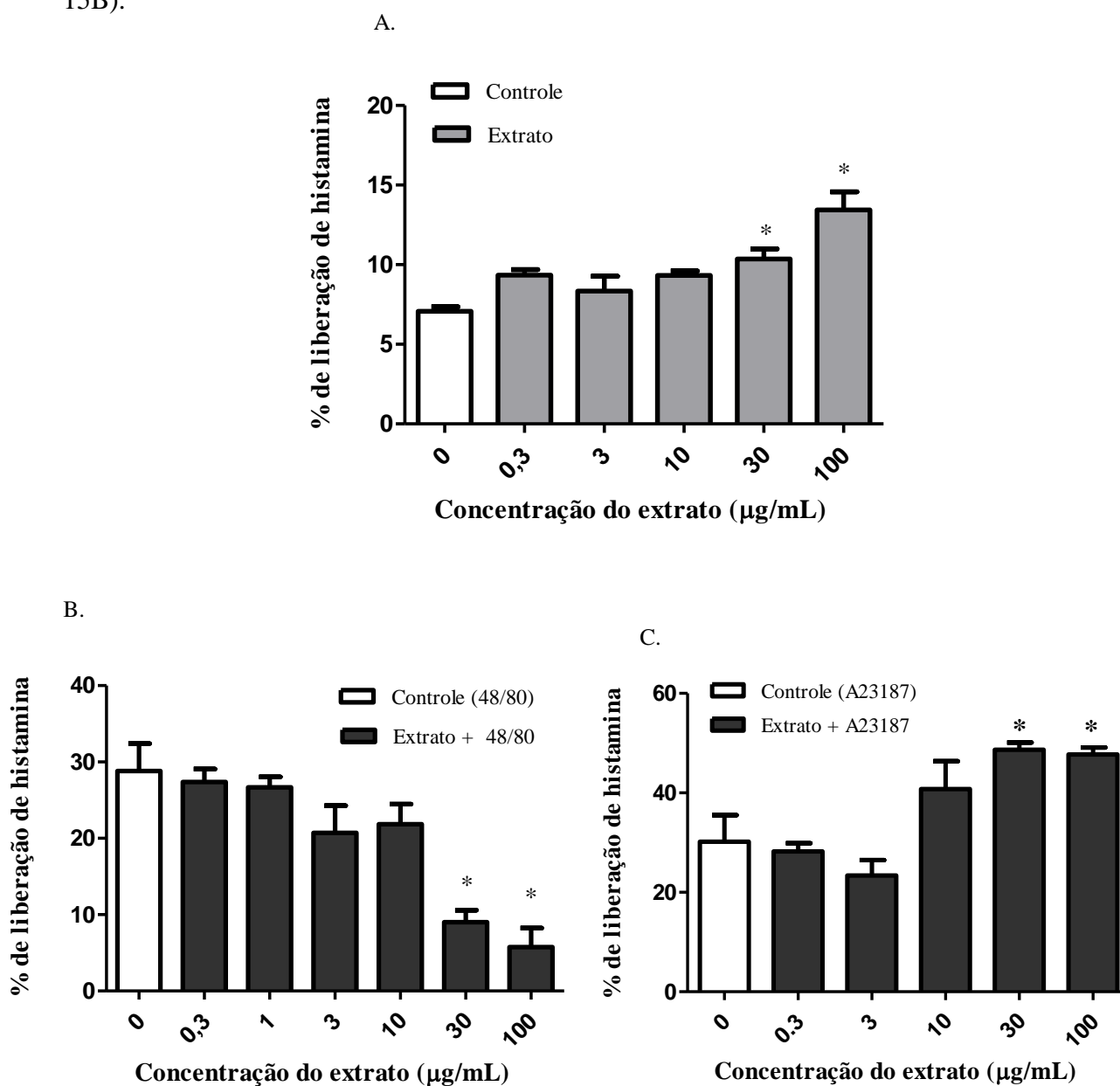


Figura 15: Efeito do extrato etanólico de folhas de *Fridericia chica* sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5 μ g/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3 μ M) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P < 0,05 versus controle.

4.5.4 Efeito do extrato de folhas de *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry sobre a liberação de histamina.

O extrato de *Mansoa alliacea* não interferiu com a liberação espontânea de histamina (Figura 16A), mas quando a liberação foi induzida por ionóforo A23187 o extrato estimulou a liberação nas concentrações crescentes de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16C). Porém quando a liberação da secreção de histamina foi induzida pelo composto 48/80 o extrato demonstrou atividade inibitória na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 16B).

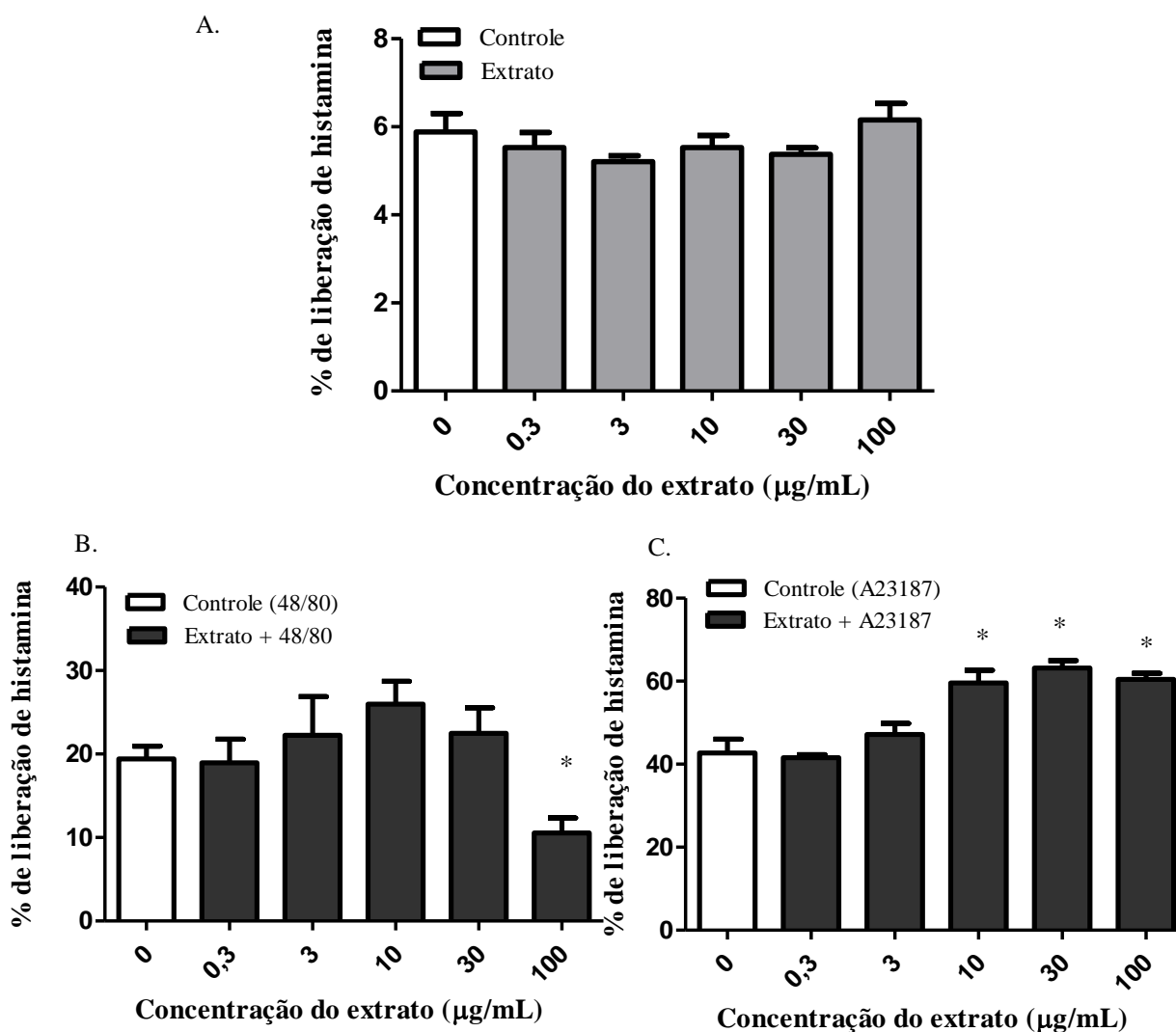


Figura 16: Efeito do extrato etanólico de folhas de *Mansoa alliacea* sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3 μM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P< 0,05 versus controle.

4.5.5 Efeito do extrato de folhas de *Luehea speciosa* Willd sobre a liberação de histamina.

O extrato de *Luehea speciosa* não interferiu com a liberação espontânea de histamina (Figura 17A), assim como não inibiu a liberação de histamina induzida por ionóforo (Figura 17C). Porém quando a liberação foi estimulada por composto 48/80, foi detectada uma inibição significativa a partir da concentração de 10 μ g/mL) (Figura 17B).

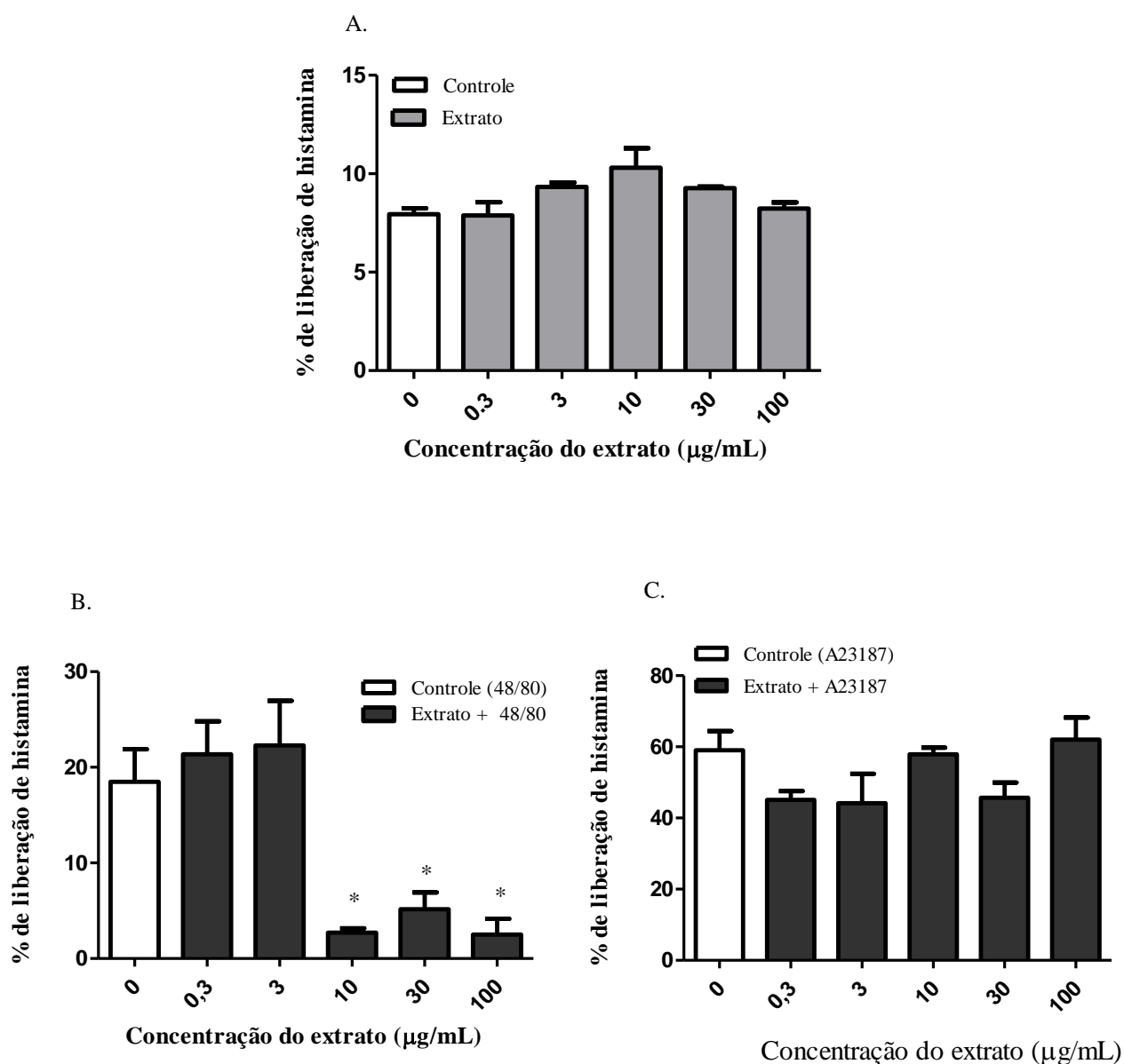


Figura 17: Efeito do extrato etanólico de folhas de *Morinda citrifolia* L. sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5 μ g/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3 μ M) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P< 0,05 versus controle.

4.5.6 Efeito dos extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) sobre a liberação de histamina

a) Extrato da casca

O extrato de casca da *Connarus perrottetii* não interferiu com a liberação espontânea de histamina e inibiu, em todas as concentrações utilizadas, a liberação de histamina induzida tanto por composto 48/80 quanto pelo ionóforo (Figura 18).

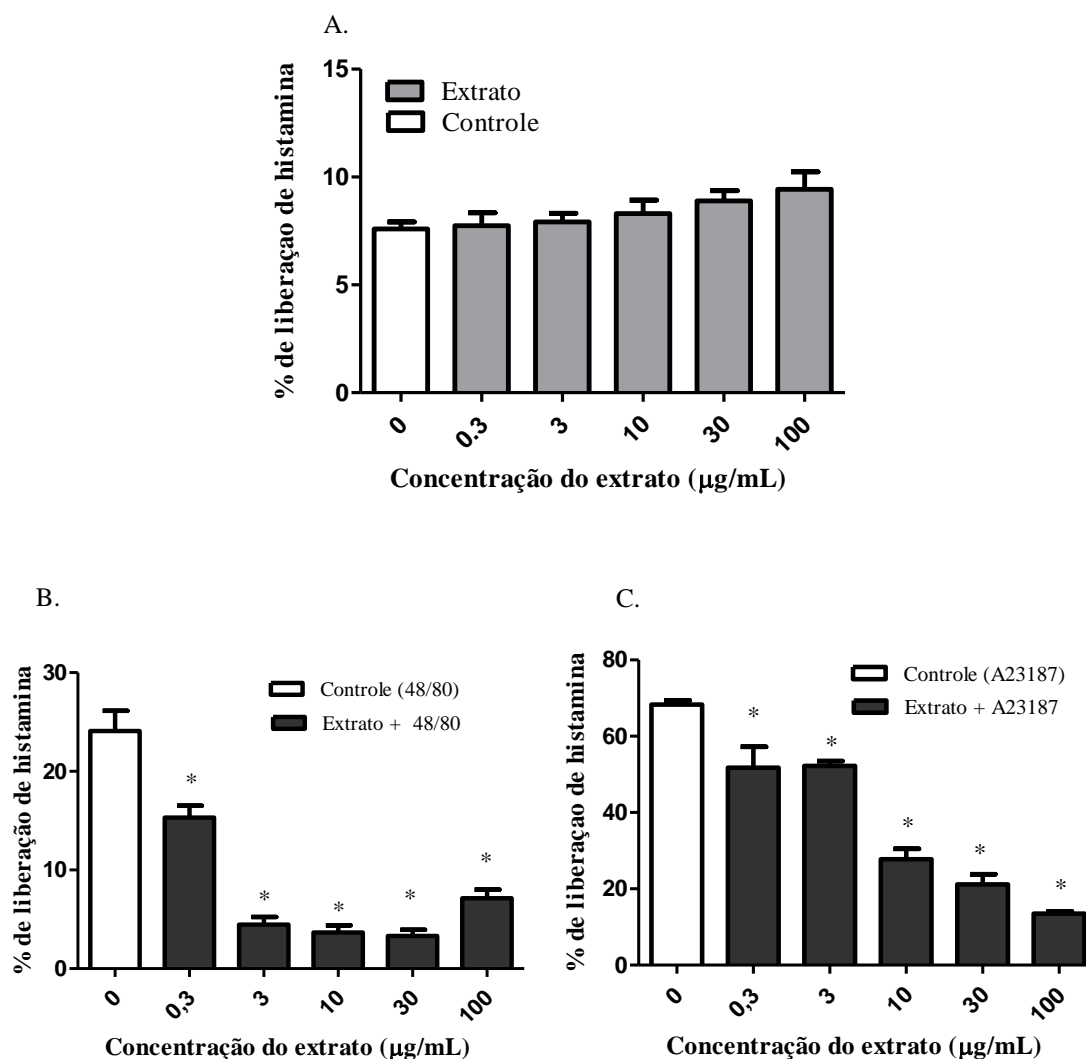


Figura 18: Efeito do extrato etanólico da casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5µg/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3µM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P< 0,05 versus controle.

b) Extrato de folhas

O extrato das folhas de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) não interferiu com a liberação espontânea. Além disso, também inibiu a liberação de histamina induzida por ionóforo em todas as concentrações utilizadas e inibiu a liberação de histamina provocada por composto 48/80 a partir de 3 μ g/mL (Figura 19).

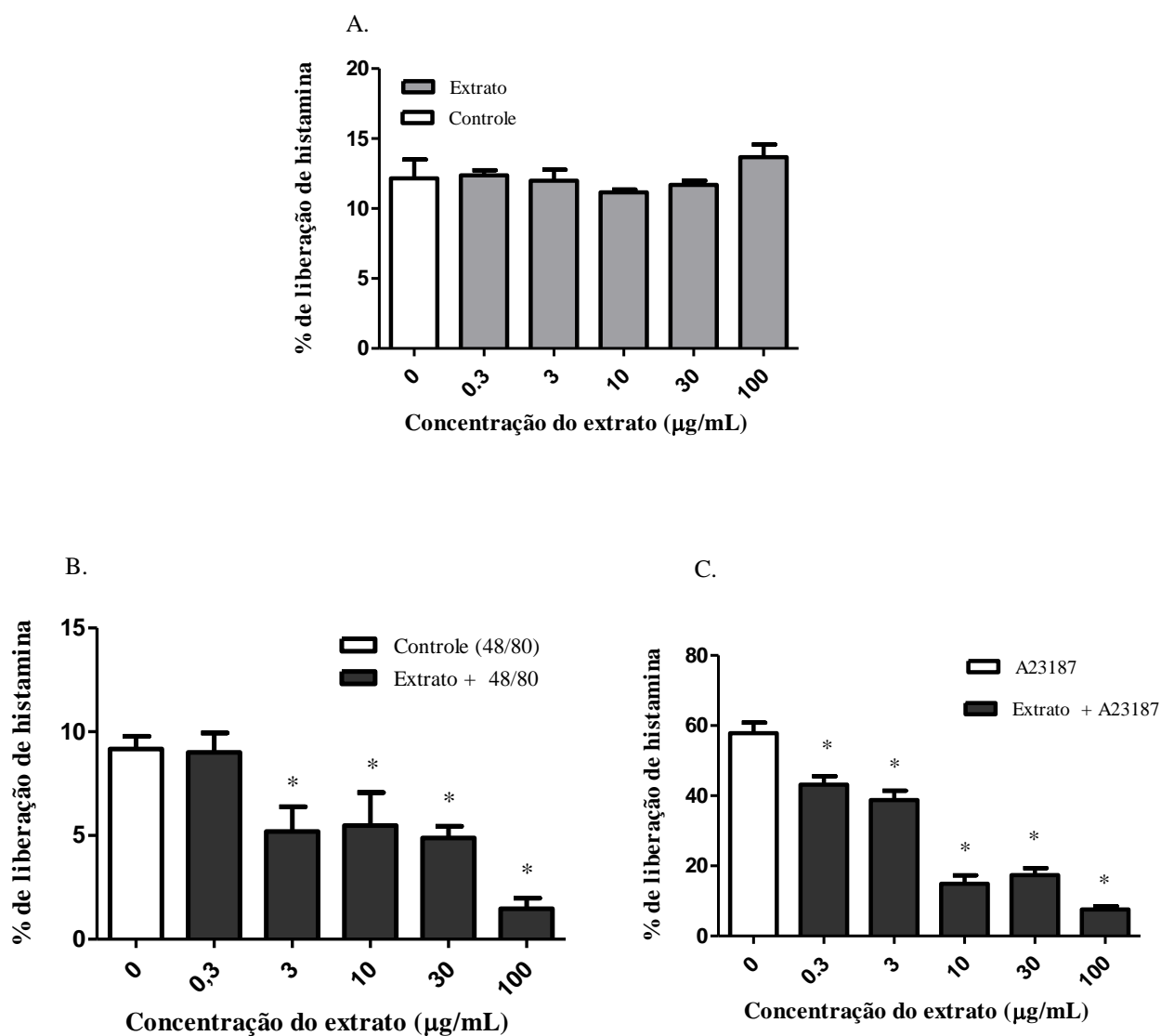


Figura 19: Efeito do extrato etanólico de folhas de *Connarus perrottetii* Var. *angustifolius* (Radlk) sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5 μ g/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3 μ M) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P< 0,05 versus controle.

4.6 Análise toxicológica do extrato que apresentou maior potência e eficácia na diminuição da liberação de histamina: toxicidade aguda e genotoxicidade do extrato de casca da *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk).

4.6.1 Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico 70% da casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk).

A administração do extrato da casca de *Connarus perrottetii* na dose de 2000mg/Kg não provocou a morte de nenhum animal. Portanto na dose testado, foi considerado não tóxico e classificado na categoria 5 (não tóxico ou de baixa toxicidade).

4.6.2 Determinação da genotoxicidade do extrato etanólico da casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk).

O extrato da casca de *Connarus perrottetii* não causou nenhum tipo de aberração cromossômica (Figura 20) na concentração máxima testada (100µg/mL) e nem alterou o índice mitótico das células (Figura 21).

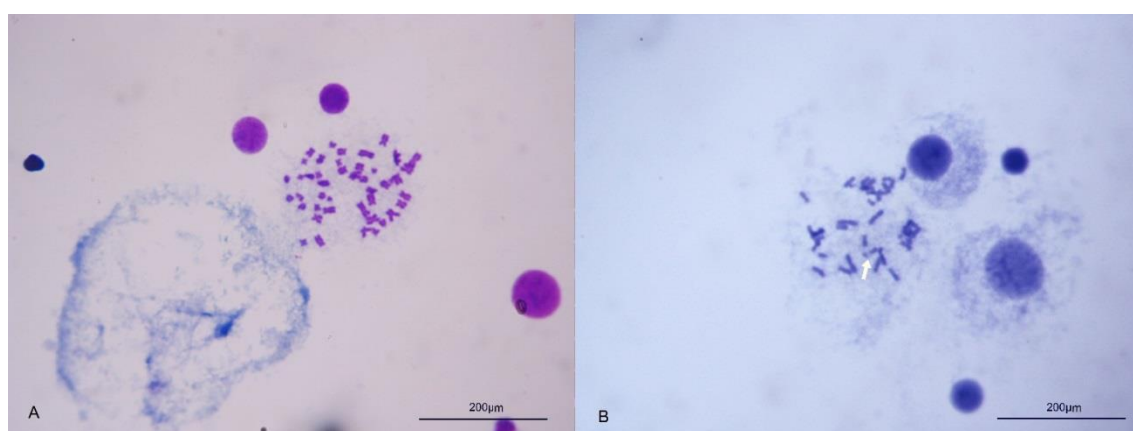


Figura 20: Metáfases encontradas nas culturas de linfócitos humanos expostas por 24 horas ao extrato de casca da *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) (100µg/mL) (A) e a ciclofosfamida (6µg/mL) (B) usada como controle positivo. A seta indica uma quebra de cromátide. Aumento: 100x, coloração: Giemsa 5%.

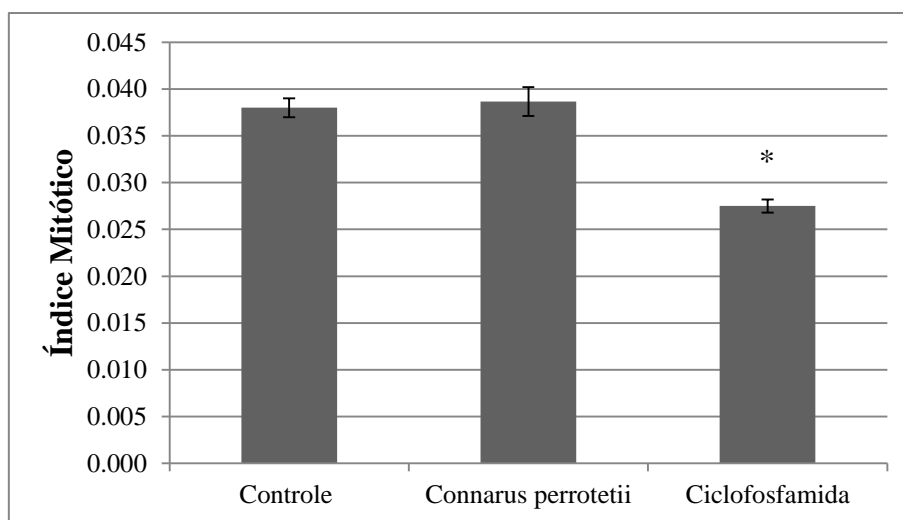


Figura 21: Índice mitótico de culturas de linfócitos humanos expostos por 24h ao extrato de casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolia* (Radlk) (100µg/mL) ou a ciclofosfamida (6µg/mL) usada como controle positivo. (n= 6). $P < 0,05$ versus controle.

4.7 Análise das frações do extrato de casca de *Connarus perrottetii* var *angustifolius* (Radlk).

4.7.1 Rendimento das frações hexânica, acetato de etila e aquosa do extrato de casca de *Connarus perrottetii* var *angustifolius* (Radlk)

Quadro11: Rendimento das frações do extrato de casca de *Connarus perrottetii* var *angustifolius* (Radlk)

Frações	FrHex	FrAcOEt	Fraq
Rendimento (%)	1,4	28,5	70

4.7.2 Perfil fitoquímico do extrato bruto e das frações da casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) pelo método de cromatografia em camada delgada .

Após nebulização com anisaldeído sulfúrico, as análises por CCD do extrato etanólico bruto das cascas de *Connarus perrottetii* indicam a presença de principalmente manchas de coloração marrom avermelhado (Fator de retenção: 0,28), acompanhadas de outras de coloração violácea (Fator de retenção: 0,85), amarelo-ouro (Fator de retenção:0,67) e azul-acinzentado (fator de retenção: 0,57), o que é indicativo da presença de taninos condensados, terpenóides, flavonóides e glicídeos, respectivamente(Figura 22).

Verificou-se ainda pelo perfil cromatográfico das frações acetato de etila e aquosa, ambas provenientes da partição do extrato bruto, que houve uma distribuição seletiva destes constituintes, sendo a primeira fração constituída sobretudo por terpenos, flavonóides e monômeros de catequinas, e a segunda por unidades poliméricas de flavan-3-ol e glicídeos (Figura 22). Estes resultados indicam resultado similar em termos de classes e substâncias presentes no extrato e frações (figura 22).

A fração hexânica do extrato apresentou bandas de coloração amarelo-ouro na região de retenção 0,2-0,5.o que é indicativo da presença de flavonóides (Figura 22).

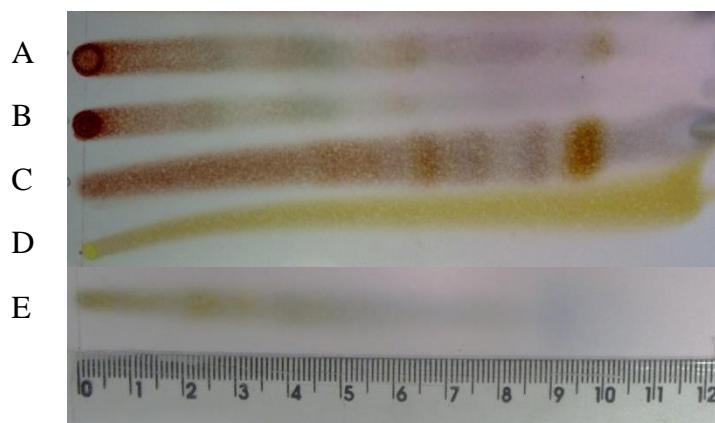


Figura 22: Análise cromatográfica do extrato bruto de casca da *Connarus perrottetii* (A) e as respectivas frações aquosa (B), acetato de etila (C) e hexânica (E). D = Padrão

4.7.3 Dosagem de histamina na presença das frações aquosa, acetato de etila e hexânica do extrato de casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*.

a) Efeito da fração aquosa (FrAq)

A FrAq não interferiu com a liberação espontânea de histamina e não foi capaz de inibir a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187, mas inibiu a liberação induzida por composto 48/80 (Figura 23).

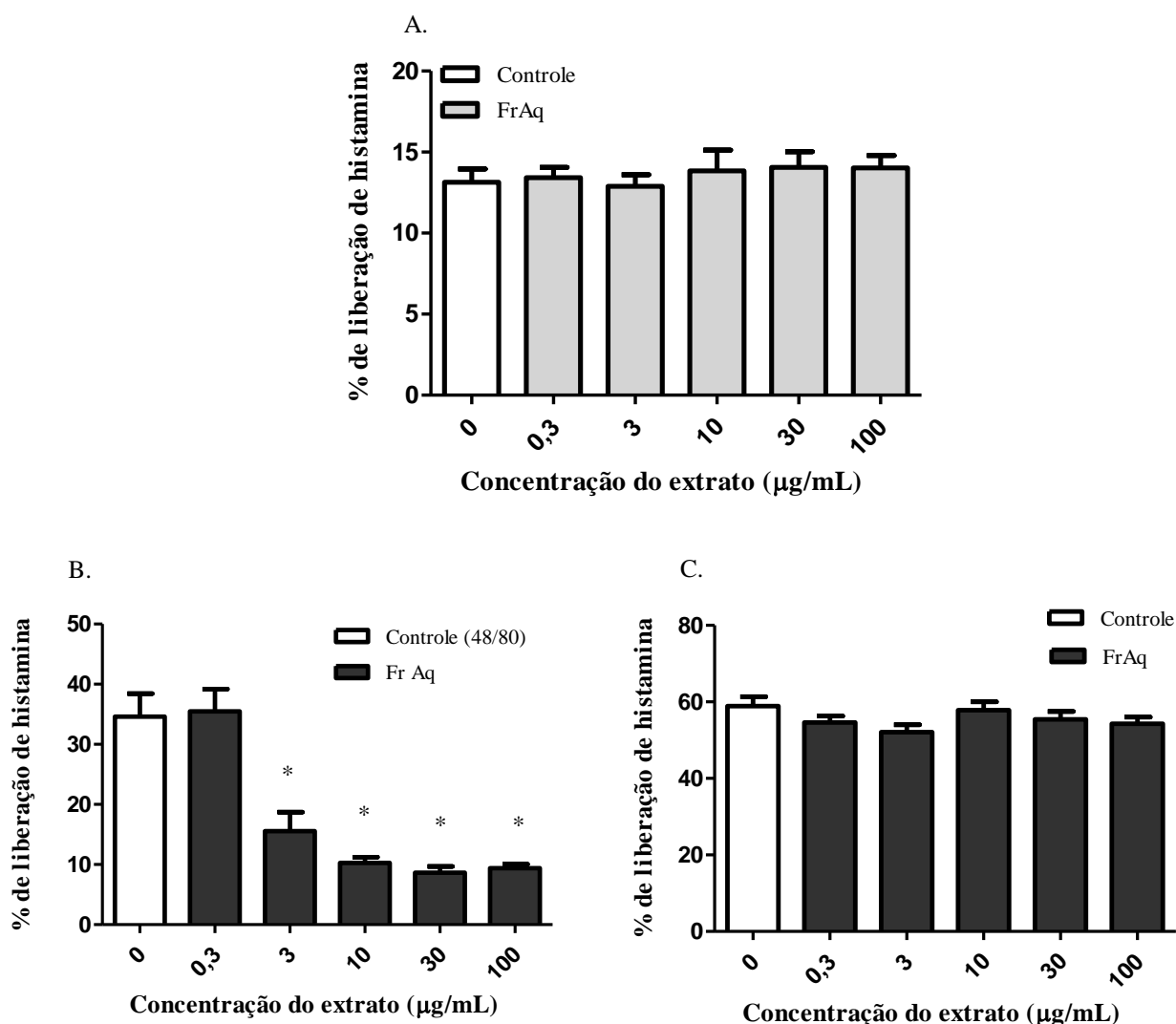


Figura 23: Efeito da fração aquosa do extrato de cascas de *Connarus perrottetii* var. *angustifolia* (Radlk) sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5 µg/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3 µM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P < 0,05 versus controle.

b) Efeito da fração acetato de etila (FrAcOEt)

A FrAcOEt não interferiu com a liberação espontânea de histamina e não foi capaz de inibir a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187, mas inibiu a liberação induzida por composto 48/80 (Figura 24).

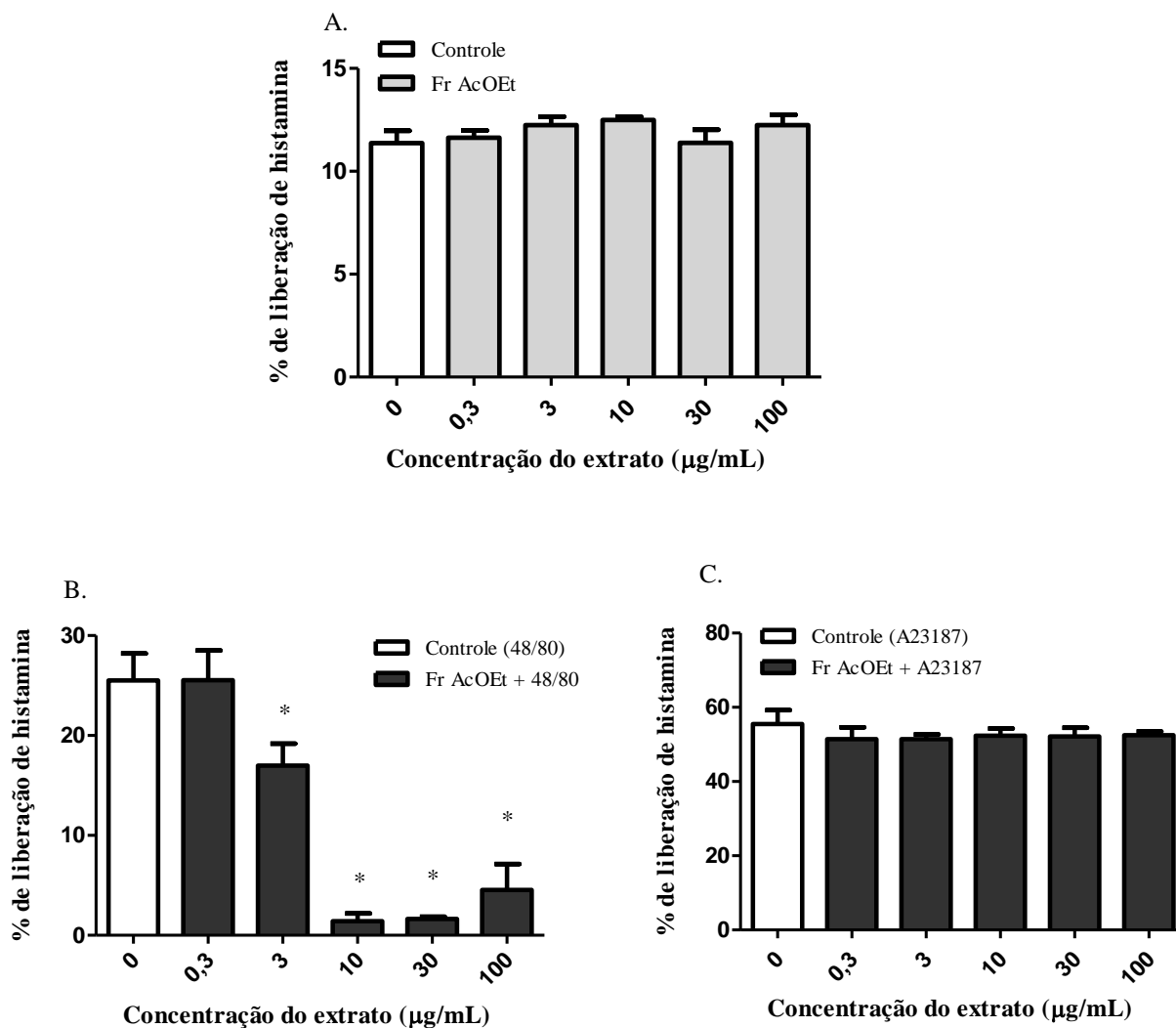


Figura 24: Efeito da fração acetato de etila do extrato de cascas de *Conarrus perrottetii* var. *Angustifolia* (Radlk) sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5µg/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3µM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P< 0,05 versus controle.

c) Efeito da fração hexânica (FrHex)

A FrHex não interferiu com a liberação espontânea de histamina e não foi capaz de inibir a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187, mas inibiu a liberação induzida por composto 48/80 (Figura 25).

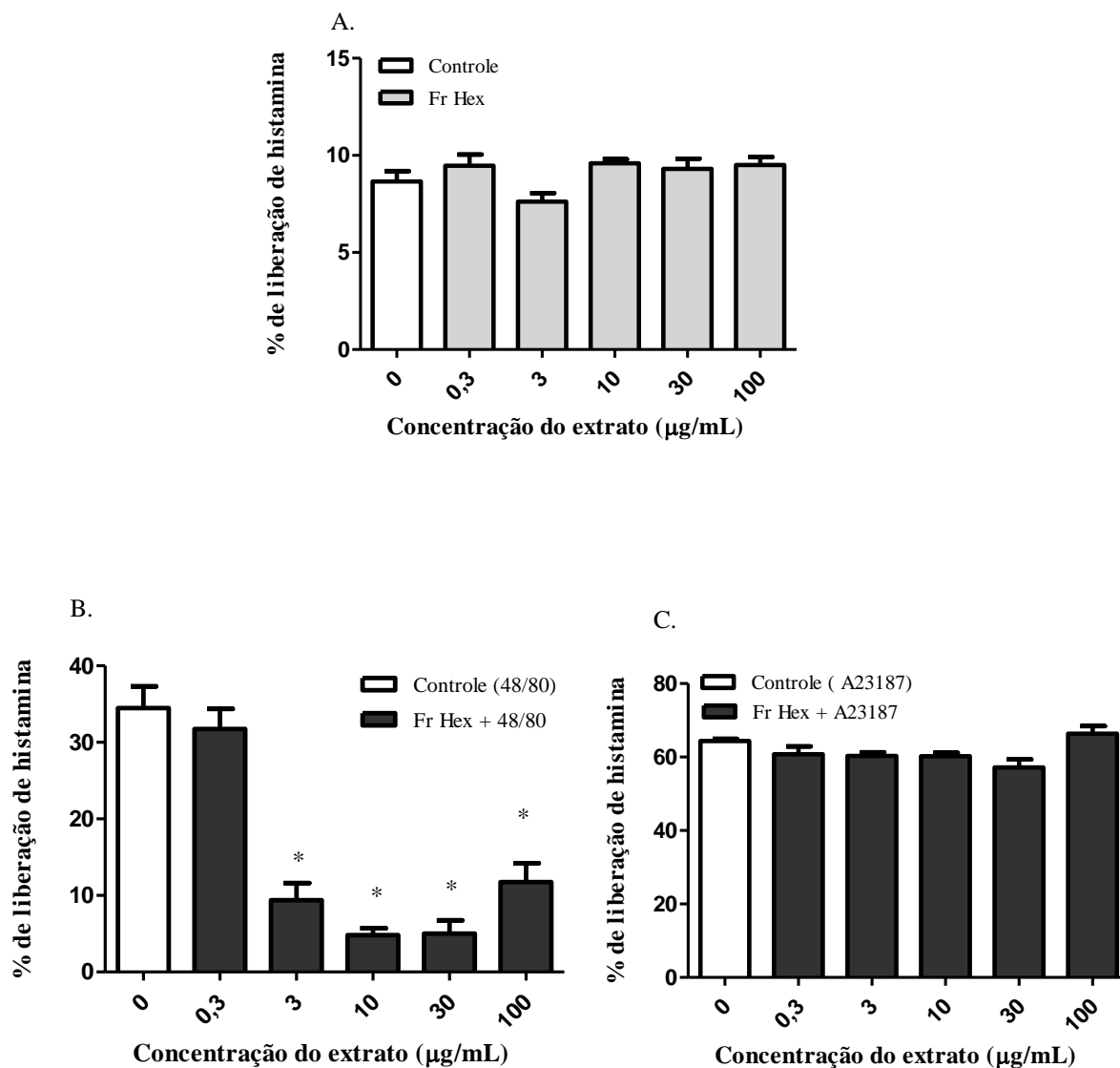


Figura 25: Efeito da fração hexânica do extrato de cascas de *Conarrus perrottetii* var. *angustifolia* (Radlk) sobre a liberação espontânea (A), sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0,5µg/mL) (B) e sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (3µM) (C), em mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. (n=4). *P< 0,05 versus controle.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra pela primeira vez a ação inibitória de cinco espécies de plantas medicinais da região amazônica (*Morinda citrifolia* Linn, *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohman, *Mansoa aliacea* (Lam.) A.H. Gentry, *Luehea speciosa* Willd e *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk.) sobre a liberação de histamina, um dos principais mediadores do processo alérgico. Dentre essas 5 plantas, o extrato que demonstrou um efeito mais potente foi o da casca da *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk), conhecida popularmente como barbatimão do Pará. Um estudo mais aprofundado desse extrato revelou uma baixa toxicidade aguda e a ausência de genotoxicidade, o que apoiaria seu uso como planta medicinal. As frações aquosa, hexânica e de acetato de etila desse extrato também apresentaram potente efeito inibitório sobre a liberação induzida de histamina. A análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada revelou a presença de taninos condensados, catequinas e flavonoides que poderiam ser os responsáveis por esses potentes efeitos.

As plantas medicinais utilizadas neste estudo são de uso popular frequente na região amazônica (Lameira & Pinto, 2008; Oliveira DPC et al., 2008; Coelho-Ferreira et al., 2009, Sousa-Nascimento, 2012) e possuem, entre outras, indicação etnomedicinal para processos inflamatórios (quadro 4), o que foi assumido como um dos critérios de seleção.

Além disso, as informações na literatura atual sobre a atividade anti-inflamatória comprovada relacionada a alergias sobre estas plantas são muito escassas ou inexistentes. Ainda, e como critérios de seleção adicionais, todas as plantas eram oriundas ou adaptadas na Amazônia e estavam disponíveis no Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA/Amazônia Oriental, que permitiu a colheita das amostras e forneceu suporte técnico para a identificação das espécies e processamento de todo o material vegetal, inclusive o método de extração utilizado na rotina do Laboratório de Agroindústria da instituição. Vale ressaltar que no Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA não são utilizados pesticidas ou quaisquer agrotóxicos nas plantas que possam vir a interferir nos testes de toxicidade.

Uma vez finalizado o processo de extração, foi realizado o cálculo de rendimento dos extratos finais obtidos (isto é, após a concentração e a determinação do teor de umidade residual) como controle de qualidade dos extratos. Dados a respeito do

rendimento de extratos após o processamento do material fresco, entre outros parâmetros, são úteis como indicadores de qualidade para a manipulação de material bruto, no que diz respeito à viabilidade para a produção de futuros fitoterápicos. Assim, o rendimento dos extratos concentrados variou de 3,8% (para o extrato da casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolia* (Radlk) a 23,1% (para o extrato de frutos de *Morinda citrifolia* Linn) (Tabela 7).

Apesar de que o rendimento do extrato da casca de *C. perrottetii* possa parecer relativamente baixo em relação aos demais extratos, este extrato demonstrou ser tão potente como inibidor da secreção de mastócitos, que não seriam necessárias grandes quantidades do extrato para obter um efeito terapêutico.

Quanto ao teor de umidade residual dos extratos, foi observado que todos os extratos apresentaram valores máximos de umidade residual (5,8% a 8%, tabela8), dentro do teor máximo (que varia de 8 a 14%) recomendado pela maioria das farmacopeias (Simões et al, 2010), o que é mais um indicativo da qualidade do processo de extração. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de microorganismos (Simões et al., 2010).

Frente aos aspectos considerados sobre a qualidade dos extratos, prosseguimos o estudo para as análises fitoquímicas e biológicas propostas sob a secreção de mastócitos.

A secreção de mastócitos é o ponto inicial para a gênese dos processos alérgicos (Körbelet al., 2012). A histamina é o mais proeminente mediador liberado de mastócitos (Diamant et al., 2010) e é considerada fundamental tanto nas reações de fase inicial e final de uma resposta alérgica, com papel importante na liberação de citocinas (IL-6, TNF,ETC.) e no processo de adesão celular (Bachert, 1998).Elevadas concentrações sanguíneas de histamina são encontradas na anafilaxia e, portanto, a amina exibe considerável importância clínica nos sinais e sintomas observados nas alergias (Lee & Thomson, 2009;Wechsler, et al., 2013).Dada a relevância das ações da histamina nos processos alérgicos, a inibição da secreção de mastócitos deverá resultar em uma melhor resposta ao tratamento ou prevenção do desenvolvimento dos processos alérgicos.

Os mastócitos representam células heterogêneas, com diferentes graus de sensibilidade aos agentes inibidores de sua secreção (Marrone et al., 1997), o que se torna um desafio para encontrar drogas com alta eficácia antialérgica sobre a inibição da secreção (Reber et al., 2012).

Todos os extratos testados demonstraram atividade inibidora da secreção de histamina, porém de modo concentração e estímulo dependente, sendo que os extratos de casca e de folha de *Connarus perrottetti* foram os mais potentes (Figuras 18 e 19).

Diferentes modelos experimentais são utilizados para avaliar a atividade ou potencial antialérgico de fármacos na busca por novos agentes antialérgicos (Reber et al., 2012). O modelo usado em nosso estudo foi a análise direta do efeito sobre a secreção de mastócitos através da extração de dosagem de histamina por método fluométrico, em que a histamina reage com ortoformaldaldeído (OPT) e gera um produto fluorescente que pode ser quantificado (Shore et al., 1959). Este método é preciso, sensível e específico para a histamina (Shore et al., 1959). A especificidade do método é considerada elevada, uma vez que outras substâncias já foram testadas como possíveis geradoras de fluoróforos (ex: histidina, norepinefrina), porém se não são extraídas não geram produtos alcalinos e mesmo que sejam extraídas precisam conjugar com o OPT para gerar algum grau de fluorescência (Shore et al., 1959).

Apesar de se tratar de um modelo *in vitro*, este permite que seja feita a avaliação do efeito direto de uma substância sobre a secreção de mastócitos contidos em suspensão celular (Gomes & de Oliveira, 2011), isto é, sem necessidade de realização de cultura de células, portanto é um ensaio que leva menos manipulação e tempo de preparação.

Uma das vantagens do modelo é que é possível utilizar mastócitos proveniente de diferentes fontes orgânicas (tecido conectivo, mucosa ou fluidos), como por exemplo, mastócitos obtidos do peritônio de rato por lavagem direta da cavidade (Gomes et al.; 1994), de bolsa jugal de hamsters (Ferreira et al., 1996) ou intestino (Luchini et al., 2009).

Assim, recentemente, demonstramos que este modelo pode ser aplicado para mastócitos com características fenotípicas diferentes e em espécies distintas de animais (de Oliveira et al., (2011). Nesse trabalho, também demonstramos que este modelo é útil como base para ensaios futuros *in vivo*, uma vez que os resultados obtidos *in vitro* condizem com os resultados obtidos com mastócitos de animais pré-tratados com o

extrato de planta (*Cordia verbenacea*) (de Oliveira et al., (2011). Ainda, uma vez que as reações com os mastócitos ocorrem *in vitro*, o número de amostras pode ser distribuído conforme as necessidades de volume para a realização do protocolo experimental, o que implica em um uso menor de animais para o estudo quando comparado com métodos *in vivo*.

Dada a importância da histamina nas respostas alérgicas e por ser o mais bem caracterizado mediador liberado de mastócitos, ela é frequentemente utilizado como marcador de secreção de mastócitos, não só nos estudos relacionados a alergia, mas também a outras condições que envolvam processo inflamatório (Luchini et al., 2009).

Fármacos capazes de diminuir ou inibir a liberação de histamina, ou seja, capazes de prevenir a secreção de mastócitos, tornam-se assim candidatas a medicamentos antialérgicos e no controle da hipersensibilidade.

Deve-se considerar que os mastócitos podem liberar histamina de maneira espontânea, isto é, sem estímulo imunológico prévio. Assim, realizar uma curva concentração resposta da substância teste sobre a liberação espontânea de histamina, como demonstrado por de Oliveira et al., (2011), proporciona uma seleção inicial das concentrações a serem utilizadas no experimentos.

Nenhum dos extratos testados aqui interferiu com a liberação espontânea de histamina, com exceção do extrato de *Fridericia chica* (pariri) nas concentrações maiores (30 e 100µg/mL) (Figura 15A). No início foi postulada a hipótese de que seria possível que elementos presentes no extrato de pariri, tais como pigmentos, poderiam ter interferido com a fluorescência das amostras quando forem usadas grandes quantidades do extrato, desde que consigam ser extraídos e gerem fluoróforos.

Além da liberação espontânea exercida pelos extratos, verificou-se a possível interferência do veículo utilizado para solubilizar os extratos, o dimetilsulfóxido (DMSO 0,2%), sobre a secreção de mastócitos em nosso modelo. Apesar de já ter sido relatada a capacidade desse composto de interferir na liberação histamina de forma depende da concentração (entre 0,6 a 10% inibe a liberação de histamina e em concentrações acima de 20% estimula) (Candussio et al., 1987), a concentração utilizada no nosso trabalho não provocou qualquer interferência na secreção dos mastócitos (Figura 12).

Para verificar se um fármaco é capaz de inibir a secreção de mastócitos, são utilizados estímulos não citotóxicos nos mastócitos pré-tratados com a droga-teste. A

secreção de mastócitos pode ser iniciada por diversas vias de sinalização bioquímica (via receptores Fc ϵ RI, toll-like, proteína G, tirosinase, tetraspaninas), por alterações físico-químicas na membrana plasmática, tais como pH, ou por vias citotóxicas (Riviera et al., 2006; Körbele et al., 2012; Sanding et al., 2012; Hosokawa et al., 2013).

Assim, no método de secreção de mastócitos, através da dosagem de histamina liberada, é possível inferir possíveis mecanismos de ação de substâncias que alterem a degranulação. Isto se faz através do uso de agentes secretores que atuem por formas já conhecidas, como os ionóforos de cálcio (ex; A23187), o composto 48/80, as lectinas, (concanavalina A) e o dextran, dentre outras substâncias estimuladoras da secreção (Ferry et al., 2002; Lopes et al., 2005; de Souza Santos et al., 2013; Hosokawa et al., 2013).

No modelo apresentado, foram utilizados dois agentes secretores, A23187 e composto 48/80, que atuam de modo não citotóxico, sendo comum a estes o aumento de cálcio intracelular.

O ionóforo A23187 induz a secreção de mastócitos por permitir alterações de permeabilidade da membrana ao cálcio, e liberação de cálcio a partir das organelas citoplasmáticas, culminando com aumento das concentrações intracelulares (Gomes et al., 1994). Este aumento de cálcio ativa a proteína cinase C e induz a fosforilação da cadeia leve de miosina no citoesqueleto de mastócitos que inicia o processo de exocitose (Ludowyke et al., 1996).

O mecanismo de ação do composto 48/80 se dá pela ativação de receptores acoplados a proteína G que por vez ativam fosfolipases C e D, proteína cinase C e aumento de cálcio intracelular, com consequente degranulação (Ferry et al.; 2002).

O presente trabalho demonstrou claramente que todos os extratos testados inibem a liberação de histamina em algum grau, de maneira dependente da concentração testada e do estímulo secretor, ou seja, provavelmente através de um ou mais fitoconstituintes que atuem por formas distintas.

Para a investigação fitoquímica dos extratos, o método utilizado em nosso estudo já foi reportado na literatura para análise de extratos obtidos por método de extração similar ao nosso, e para investigação de constituintes químicos relacionados a atividade anti-ulcerogênica, e portanto anti-inflamatória (Gonzales & Di Stasi, 2002). Entretanto,

é importante lembrar que este método fitoquímico detecta presença ou ausência dos compostos, mas ele não é quantitativo, sendo necessário por isso, estudos posteriores com a planta de interesse, que quantifiquem os fitoconstituintes detectados inicialmente, com o intuito de determinar o grau de participação de cada composto no efeito encontrado.

De um modo geral todos os extratos analisados quanto à fitoquímica contêm carotenoides, saponinas, açúcares redutores e esteroides (com exceção dos extratos de *Morinda citrifolia* Linn e de cascas de *Connarus perrottetii* onde não foram detectados a presença de carotenoides). Entre estas classes de compostos alguns podem exibir potencial efeito antialérgico ou reduzir a liberação de histamina tais como, carotenoides (Cantwel & Forema, 1989) e as saponinas (Han et al., 2009).

Em relação aos carotenoides, foi sugerido que estas substâncias podem diminuir a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato induzida por A23187 e por composto 48/80 (Cantwel & Forema, 1989), como poderia estar acontecendo no nosso estudo. Entretanto, não foram encontrados na literatura muitos estudos a respeito da interação destes compostos com a histamina.

Quanto aos açúcares redutores inespecíficos, não há dados consistentes até o presente que apontem uma relação estreita destes compostos com a liberação de histamina. Já os esteroides dependendo do tipo de sua estrutura química, podem inibir (Koet al, 2008) ou promover um potente efeito citotóxico (Chiesa & Moyna, 2004).

Por outro lado, os resultados de nossa investigação fitoquímica, revelam também classes de compostos com potencial anti-inflamatório e antialérgico presentes nos extratos (polifenóis: flavonóides, taninos, catequinas) além de triterpenóides e cumarinas (Quadro 9). Dada a presença dos diferentes polifenóis com potencial anti-inflamatório detectados em nossa prospecção fitoquímica qualitativa, foi realizada a análise quantitativa de compostos fenólicos em todos os extratos, como análise complementar.

Todos os extratos analisados apresentaram a presença de taninos. Em geral acredita-se que as atividades farmacológicas destes compostos são devidas pelo menos em parte, a três características gerais, que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos (hidrolisáveis e condensados): 1) complexação com íons metálicos

(ferro, manganês, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e 3) habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (Haslam, 1996; Haslam, 1998).

Foi sugerido que os possíveis mecanismos de ação dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente ligados a essas três propriedades, apesar de que possam atuar de forma seletiva, em função de sua estrutura química, ligando-se preferencialmente a certos receptores de modo reversível ou irreversível (Zhu et al., 1997).

Os flavonoides, detectados nos extratos de *Fridericia chica* e de *Connarus perrottetii* (casca), ao lado quantidades significativa de compostos fenólicos (tabela 10 e Figura 11) podem atuar por diversos mecanismos de ação para promover efeito anti-inflamatório e antialérgico, como através da inibição da liberação e síntese de substâncias endógenas que promovem inflamação, como a histamina (Amella et al., 1985; Chi et al., 2001; Chirumbolo et al., 2010).

Os flavonóides isolados ou presentes em grandes quantidades em extratos de plantas com propriedades medicinais vêm cada vez mais sendo apontados como agentes inibidores da secreção de mastócitos, com ação mais potente que algumas drogas clássicas inibidoras, como cromoglicato de sódio (Park et al., 2008; Andhare et al., 2012; Weng et al., 2013). A quercetina, por exemplo, conhecido flavonoide isolado de *Quercus sp*, e presente em inúmeras espécies medicinais, possui atividades anti-inflamatória e antialérgica bem reportadas (Weng et al., 2013) agindo por mais de um mecanismo de ação. Parte de seu efeito antialérgico se dá pela inibição da secreção de mastócitos através da diminuição dos níveis citossólicos de cálcio (Weng et al., 2013) e da diminuição da atividade de proteína cinase (via inibição de fosfoditiisitol trifosfato), além de interferir na liberação mediada pela imunoglobulina E (Chirumbolo et al., 2010).

Outro mecanismo atribuído aos flavonoides é a capacidade de estabilizar a membrana de basófilos e mastócitos, prevenindo assim o desencadeamento da secreção de histamina (Pearce, 1984). Já outra classe de flavonoides, as procianidinas, são capazes de evitar a secreção de mastócitos ao impedir a ligação de moléculas de

imunoglobulina E ao receptor FcepsilonRI (Tokura et al., 2005). Ainda, as antocianinas parecem ser capazes de inibir a liberação de histamina *in vivo* em modelo de prurido induzido por composto 48/808 (Yamamura et al.; 2012).

Todos esses dados demonstram que os flavonoides são um amplo grupo de compostos com diversificados mecanismos de ação relacionados às atividades anti-inflamatória e antialérgica. Assim, eles fornecem a base para relacionarmos a presença destas substâncias aos efeitos inibidores da liberação de histamina encontrados em nossos resultados para o extrato bruto de casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolia* e para o extrato de folhas de *Fridericia chica*.

Quanto à essa última planta, a *Fridericia chica* (pariri), que já é amplamente utilizada pela população como anti-inflamatório e cicatrizante (Jorge et al., 2008), nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, um potencial efeito antialérgico comprovado, uma vez que observamos um efeito inibitório sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/88 (figura15B). Este resultado contribui para elucidar mais uma via de ação dos princípios ativos do pariri, ao lado da já reportada ação anti-inflamatória, através da inibição de cicloxigenase (de Oliveira DPC et al., 2008).

Uma vez que o efeito antissecretor sobre os mastócitos, foi observado apenas na presença do composto 48/80, possivelmente os princípios responsáveis pelo efeito bloqueiem os receptores acoplados a proteína G utilizados pelo composto 48/80.

Ainda, princípios como os flavonoides poderiam interferir em algum ponto da via de sinalização do composto 48/80, como a inativação de proteína cinase C necessária para aumento das concentrações de cálcio intracelular (Chirumbolo et al., 2010), impedindo assim o processo exocitose dos mastócitos com a liberação de histamina.

É provável que a relevante quantidade de compostos fenólicos (134,77 mg/EAG) encontrada nesse extrato esteja relacionada aos flavonoides, que podem ser os compostos majoritários diretamente relacionados ao efeito inibidor da secreção de histamina, assim como anteriormente foram correlacionados como princípios ativos responsáveis pela ação anti-inflamatória do extrato de *Fridericia chica* (de Oliveira DPC et al., 2008).

Adicionalmente aos flavonoides, outros compostos fenólicos (taninos, catequinas), revelados no extrato de *Fridericia chica*, poderiam estar também envolvidos na inibição da liberação de histamina, sem descartar a possibilidade de envolvimento de compostos reconhecidamente relacionados à atividade antialérgica, e mais, inibidores da secreção de mastócitos como alguns tipos de cumarina (de Souza Santos et al., 2013) e os compostos triterpenóides (Andhare et al., 2012).

Porém, o extrato de *Fridericia chica* curiosamente demonstrou um aumento na porcentagem de histamina liberada de forma espontânea e induzida por ionóforo A23187 em concentrações elevadas (30 e 100 µg/mL) (figura 15 A e C). O aumento da liberação de histamina nestas duas condições pode ter ocorrido em função da presença de fortes pigmentos naturais como a carajurona e acarajurina, compostos derivados das 3-deoxiantocianidinas como a antocianidina, o pigmento 1, o pigmento 2 e a luteolina e flavona carajuru (Takemura et al., 1995; Zorn, 2001; Alcerito et al., 2002; Devia et al. 2002). É possível que estes pigmentos tenham interferido com o aumento de fluorescência das amostras mais concentradas, no momento da extração e dosagem de histamina.

Ainda assim o extrato de *Fridericia chica* apresentou efeito inibitório sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80. Este pode ser atribuído aos flavonoides; contudo não é possível descartar a possibilidade de ação dos derivados cumarínicos, taninos condensados (catequinas) e terpenóides.

Os mesmos elementos foram encontrados não só no extrato de folhas de *Fridericia chica*, mas também no extrato do fruto de *Morinda citrifolia* Linn e podem estar implicados no efeito inibitório da liberação de histamina do extrato de fruto dessa última planta.

Em esse último extrato (de fruto da *Morinda citrifolia* Linn) não foram detectados níveis significativos de flavonoides, provavelmente devido ao baixo teor de compostos fenólicos presentes (30,56mg EAG/g extrato seco). Assim, possivelmente para o extrato de *Morinda citrifolia* Linn, os flavonoides não sejam os responsáveis pelo efeito inibidor observado. Esta possibilidade acaba por apoiar a ideia de que o efeito inibidor da secreção de mastócitos do extrato possa estar relacionado à ação de taninos e/ou terpenóides.

Os terpenóides são óleos voláteis que são reconhecidamente implicados na atividade anti-inflamatória (Jung et al., 2005) e anti-alérgica, por serem capazes de diminuir sintomas relacionados a alergia, como prurido (Oliveira et al., 2004). Ainda, os terpenóides, podem exercer ação inibitória sobre a secreção de mastócitos (Andhare et al., 2012) induzida por estímulo imunológico (Shoji et al.; 1992) ou por agentes secretores (composto 48/80), tal como observado em nossos dados para os extratos onde foram encontrados terpenóides (*Fridericia chica* e *Morinda citrifolia* Linn).

No caso de *Morinda citrifolia* Linn, além de inibir a secreção induzida por composto 48/80, o extrato proveniente dos frutos, mas não das folhas da planta, também diminuiu em concentrações baixas (0,3 e 3µg/mL) a liberação de histamina induzida por ionóforo de cálcio (Figuras 13 e 14). A diferença de efeito entre os extratos oriundos da mesma planta, pode ter se dado em função de que no extrato das folhas não tenham sido encontrados traços de terpenóides. Isso seria mais uma prova de que provavelmente estes são os agentes responsáveis pelo efeito inibidor, e não outros compostos com efeito antialérgico, como taninos, encontrados tanto no extrato das folhas como de fruto.

Inclusive, o fato de o efeito ter se dado a baixas concentrações e sob estímulos diferentes (composto 48/80 e ionóforo A23187), denotaria que estes princípios ativos (terpenóides ou taninos) possam ser mais potentes do que os do extrato de *Fridericia chica* (com efeito inibitório apenas a partir de concentrações maiores (30 e 100µg/mL) e apenas perante a estimulação induzida pelo composto 48/80.

Considerando o fato de que o efeito inibidor da secreção de mastócitos de *Morinda citrifolia* Linn foi detectado com os dois estímulos secretores que agem por mecanismos diferentes (Figura 13), pode ser sugerido que os compostos anti-secretores presentes no extrato, atuem interferindo na disponibilidade de cálcio necessária para a exocitose (evento comum ao mecanismo de ação de ambos os compostos, 48/80 e ionóforo A23187). Entretanto, estudos adicionais precisarão ser realizados para esclarecer totalmente o mecanismo, especialmente considerando que quando aumentadas as concentrações do extrato o efeito não foi evidente.

Os resultados então indicam que outros compostos, que não necessariamente flavonoides, são responsáveis pelo efeito inibidor da secreção de mastócitos. Isso seria uma nova contribuição para o conhecimento sobre essa planta, diferente do que havia sido sugerido previamente onde o efeito do extrato do fruto de *Morinda citrifolia* Linn

foi atribuído à ação de flavonoides que estariam agindo como antagonistas de receptor H_1 (Brett et al., 2009).

Além disso, nossos achados contradizem o efeito histaminérgico espasmogênico que o extrato do fruto de *Morinda citrifolia* Linn exibiu em modelo de contração de íleo de cobaia (Wang et al., 2002). Isto poderia ser atribuído a possíveis diferenças de constituição fitoquímica entre os extratos, dadas pela origem das plantas estudadas, o que conseqüentemente pode interferir na atividade farmacológica.

Em nosso caso os compostos encontrados, estão de acordo com as classes de metabólitos já descritos [polissacarídeos, glicosídeos do ácido graxo, iridóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, lignanas, fitoesteróis, carotenóides e uma gama de substâncias voláteis, incluindo monoterpenos, ácidos graxos de cadeia curta e ésteres de ácidos graxos (Poterrat & Hamburger, 2007)], mesmo que alguns compostos não tenham sido detectados (antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos), talvez por conter pequenos traços destas substâncias.

A triagem sobre o potencial antialérgico das plantas segue com a avaliação do efeito e análise dos componentes químicos do extrato de *Luehea speciosa* Willd, espécie que tem como uma de suas indicações na medicina popular, o uso para afecções de origem inflamatória (artrite, reumatismo) (Veiga, 1992).

Está é a primeira vez que é feita uma investigação biológica sobre a uma possível atividade terapêutica de *Luehea speciosa* Willd. Esse extrato inibiu a liberação de mastócitos promovida pelo composto 48/80 (a partir de 10 μ g/mL), embora não tenha sido observado efeito inibidor quando o estímulo foi provocado pelo ionóforo A23187 (Figura 17). Esse resultado é inédito e já aponta que os constituintes presentes podem ser capazes de diminuir a secreção de mastócitos na presença de compostos básicos, como é o composto 48/80.

A análise fitoquímica realizada com o extrato de *Luehea speciosa* Willd (açoita-cavalo) revelou a presença de importantes compostos de classes com ação anti-inflamatória, como fenóis, taninos e catequinas as quais podem ser responsáveis pelo efeito observado.

Além destes compostos, o extrato apresentou 246,38 mgEAG/g de compostos fenólicos (tabela 10). Essa quantidade de compostos fenólicos foi muito superior ao encontrado em preparações em forma de infusão de folhas de *Luehea speciosa* Willd (47.54 mgEAG/g) (Singleton e Lamuela-Raventos, 1999). Ainda, embora nossa prospecção fitoquímica não foi detectado a presença de flavonoides, certa quantidade deles já foi detectada na infusão de folhas de *Luehea speciosa* Willd (Da Silva Port`s et al., 2013). Uma possível explicação para estas diferenças seria que o método de extração empregado foi diferente em cada estudo.

Cabe destacar que não há até o momento uma descrição completa do perfil fitoquímico de *Luehea speciosa* Willd e que a única propriedade farmacológica reportada até o presente é seu potencial antioxidante em ensaios de triagem com 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Da Silva Port`s et al., 2013). Por esta razão nosso trabalho torna-se pioneiro em fornecer dados fitoquímicos sobre essa espécie que demonstrou ter potencial sobre a inibição da secreção de mastócitos.

Também, o extrato das folhas de *Mansoa alliacea* demonstrou ser capaz de inibir a liberação de histamina quando a degranulação de mastócitos foi induzida pelo composto 48/80 (Figura 16). Porém isso aconteceu apenas na maior concentração utilizada do extrato (100µg/mL), o que indicaria uma potência menor de efeito em relação aos demais extratos analisados.

O efeito observado pode ser atribuído a menores quantidades de compostos fenólicos encontrados (57,59mg/EAG de extrato seco).

Ainda o efeito anti-secretor de mastócitos de *Mansoa alliacea*, poderia ser também atribuído a outra classe de compostos, as cumarinas. Os derivados da cumarina já tem atividade antialérgica bem reportada. Foi demonstrando que a scoparona (6,7-dimethoxycoumarin) conseguiu suprimir reações alérgicas locais induzidas em ratos (Choi e Yan, 2009). Extratos de plantas, ricos em derivados cumarínicos também diminuiriam drasticamente os sintomas de dermatite alérgica de contato em modelos animais (Joo et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que uma cumarina (3-Arylcoumarins), foi capaz de inibir a secreção de mastócitos induzida por antígeno no pelo ensaio utilizando como biomarcador da degranulação a beta-hexosaminidase (de Souza Santos et al., 2013).

O perfil fitoquímico da *Mansoa alliacea* revelado em nossas análises apontou a presença de alcaloides, triterpenóides e flavonóides, o que corrobora com dados demonstrados na literatura (Zoghbi, et al., 2009).

Apesar do efeito inibitório sobre a secreção de histamina pelo composto 48/80, a *Mansoa alliacea* teve efeito sinérgico com o ionóforo A23187 na liberação de histamina a partir da concentração de (10µg/mL) (figura19). Isto pode ser devido à presença e ação de compostos alcalóides (Quadro 9) que, dependendo do tipo em questão, podem ser tóxicos e capazes de liberar histamina. Um exemplo seria a morfina, um alcaloide isolado de planta, que já é conhecido como agente capaz de induzir a liberação de histamina de mastócitos (Baldo e Phan, 2012).

Entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar se outros compostos presentes na *Mansoa alliacea*, além dos que já foram discutidos, podem ter contribuído para o efeito liberador de histamina na presença de A23187.

Entre todos os resultados obtidos no nosso estudo de triagem dos extratos dessas cinco plantas, aqueles da casca e da folha de *Connarus perrottetti*, foram os que tiveram efeito inibitório mais relevante (Figuras 18 e 19).

Apesar das principais indicações etnomedicinais do barbatimão do Pará, como é conhecida a *Connarus perrottetti*, estarem relacionadas com o tratamento de afecções inflamatórias (Coelho-Ferreira, 2009), não havia estudos que avaliassem sua atividade farmacológica até o momento. Assim, demonstramos pela primeira vez o grande potencial terapêutico desta planta sobre a inibição de secreção de mastócitos, células-chaves na gênese de alergias e processos que envolvam a liberação e histamina.

Em nossa avaliação tanto o extrato proveniente das folhas quanto o das cascas de *Connarus perrottetti* apresentaram efeitos similares sobre a liberação espontânea de histamina (Figuras 18 e 19) e ambos inibiram com alta eficácia a liberação de histamina induzida pelos dois mecanismos de liberação utilizados (Figuras 18 e 19).

Possivelmente este efeito esteja relacionado ao elevado teor de composto fenólicos presentes em ambos os extratos (411,21mg/EAG para o extrato das folhas e 391,65 mg/EAG para o extrato das cascas) (tabela10). O perfil fitoquímico dos extratos revelou compostos com grande potencial de atividade inibidora de mastócitos e anti-

inflamatória (esteroides, cumarinas, terpenos, flavonóides, taninos gerais e taninos condensados (catequinas) (Quadro 9).

No extrato da casca de *C. perrottetii* também foi detectada a presença de glicosídeos cardiotônicos, porém o papel destes na liberação de histamina de mastócito ainda é controverso. A bomba Na^+/K^+ ATPase, alvo de ação dos glicosídeos cardíacos (por exemplo: ouabaína e digoxina, digitoxina) pode desempenhar um papel na regulação da secreção de mastócitos principalmente através da modulação dos estoques de cálcio citoplasmáticos e a acessibilidade de cálcio sensíveis à calmodulina (Knudsen, 1995). Alguns trabalhos demonstram que a interação destes compostos aumentam, inibem ou não alteram a liberação de histamina, sugerindo que o efeito pode ser influenciado pela origem dos mastócitos (Senol et al., 2007).

Os mastócitos peritoneais de rato, suspensão utilizada em nosso estudo, parecem ser sensíveis à ação de glicosídeos cardiotônicos (ouabaína) e na presença destes secretam mais histamina (Lago et al., 2001), portanto provavelmente estas substâncias encontradas no extrato da casca de *Connarus perrottetii*, não estão relacionadas ao efeito inibitório aqui demonstrado.

Frente à alta intensidade do efeito inibidor da secreção de mastócitos observado, e baseado na análise fitoquímica do extrato, possivelmente este efeito poderia ser atribuído aos taninos condensados, especialmente às catequinas, apesar da presença flavonoides.

As catequinas já tem sido reportadas como substâncias antialérgicas (Venkatesh et al., 2010). A epicatechin-3-O-(3"-O-methyl)-gallate isolada da *Camellia sinensis* L. (chá-verde) demonstrou efeito inibitório sobre a liberação de histamina de mastócitos de medula óssea de camundongo (Maeta-Yamamoto et al., 2012). Assim como a atividade antialérgica do extrato de *Diospyros kaki* (caqui), foi atribuído ação de catequinas presentes (epicatequina) (Kim, et al, 2013) as quais estariam promovendo a elevação nos níveis de AMPcíclico com conseqüente prejuízo a degranulação dos mastócitos.

Drogas que ativam a adenilato ciclase ou inibem as fosfodiesterases, reduzem a liberação de histamina de mastócitos por aumentar os níveis de AMPc, e assim diminuem a mobilização do cálcio a partir das organelas comprometendo os níveis de

cálcio intracelular necessários para a exocitose dos mediadores bioquímicos (Makino et al., 1987).

Portanto, ao correlacionar o pronunciado efeito inibitório do extrato da casca e das folhas de *Connarus perrottetii* com as catequinas perante a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80, é possível sugerir que o modo de ação destas poderia estar relacionado a esta via de sinalização envolvendo o AMPc.

Cabe destacar que entre todos os extratos estudados em este trabalho, o extrato de cascas de *Connarus perrottetii* foi o mais potente no efeito inibitório sobre a liberação da histamina (Figura 18), constituindo o candidato mais promissor para um efeito antialérgico via histamina.

Assim, esse extrato foi selecionado para um estudo mais aprofundado. Primeiro foi realizada uma triagem toxicológica (através do estudo da toxicidade aguda *in vivo* e da genotoxicidade em cultura de linfócitos humanos) para, posteriormente, proceder ao fracionamento e análise das frações, as quais foram comparadas também com a análise cromatográfica das frações do extrato das folhas.

Na triagem toxicológica aguda do extrato de cascas de *Connarus perrottetii*, o mesmo foi considerado seguro (categoria 5), segundo o guia OCD425 para análises toxicológicas (OECD,2008), considerada assim menos tóxica do que a teofilina, fármaco utilizado no tratamento da asma com capacidade de diminuir a secreção de mastócitos, porém com baixa margem de segurança (Shichijo et al.,1998).

Este trabalho também teve por objetivo avaliar *in vitro* os possíveis efeitos genotóxicos do extrato da casca de *Connarus perrottetii* uma vez que este foi o que apresentou maior eficácia sob a inibição da liberação de histamina além de ser a parte da planta mais utilizada na tradição popular (Coelho-Ferreira, 2009).

A técnica de aberrações cromossômicas (AC) utilizando cultura de linfócitos humanos, assim como outras técnicas de avaliação de dano citogenético (como a detecção de micronúcleos), vem sendo utilizada com frequência como importante ferramenta para a detecção de substâncias capazes de causar alterações genéticas, que levem a ocorrência de câncer ou má formações (Fenech, 2000; Silva et al., 2003; Bonassi et al., 2005; Mateuca et al., 2006).

Uma das grandes vantagens do modelo é a utilização de linfócitos do sangue periférico de humanos, considerada uma das mais importantes fontes de material para o estudo do processo mitótico. Isto porque tais células, que normalmente não se multiplicam *in vivo*, entram ativamente em mitose e a completam *in vitro*, desde que estimuladas de modo apropriado (Beiguelman, 1982).

O sangue periférico é o tecido mais utilizado para o diagnóstico citogenético porque além da facilidade de obtenção do material, fornece elementos, para fazer uma cultura primária utilizando linfócitos humanos, que permite uma extrapolação mais direta dos efeitos dos fármacos testados para a população humana e é uma cultura que exhibe simplicidade de cultivo (Gus, 2011).

Através do teste para detecção de aberrações cromossômicas, é possível a identificação de dois tipos de substâncias mutagênicas, as clastogênicas, que são aquelas que produzem aberrações estruturais (quebras e “gaps”), e as substâncias aneugênicas, que produzem aberrações numéricas (devido uma interferência na formação do fuso mitótico o que provoca alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular). Na maioria das vezes traz consequências maléficas, pois estas alterações causam proliferação celular desregulada, o que conseqüentemente favorece a ocorrência de neoplasias. (Silva et al., 2003).

A análise pode ser feita não só para fármacos, mas também para extratos oriundos de fontes naturais com reconhecida eficácia, como já foi descrito para o extrato de *Fridericia chica* que não demonstrou ser genotóxico em cultura de linfócitos humanos (dos Santos et al., 2013).

Apesar da importância desse tipo de estudo, é realmente escassa a literatura que existe sobre avaliação genotóxica de produtos naturais. Assim, nunca foram realizados estudos até hoje que avaliem se a *Connarus perrottetii* é capaz de causar dano genético em cultura primária de linfócitos humanos.

Unicamente existe um estudo, realizado *in vitro* em cultura de células de linhagem de câncer de colón humano (KM-124) em que o extrato de *Connarus perrottetii* na mesma concentração testada aqui (100 µg/mL) demonstrou ser citotóxico (Suffredini et al., 2006). Porém neste caso, essa atividade revelou mais um potencial terapêutico do extrato, como anticancerígeno.

No nosso estudo, a exposição temporária dos linfócitos humanos à maior concentração do extrato de *Connarus perrottetii* utilizada nos ensaios de liberação de histamina (100 µg/mL) não induziu a formação de aberrações cromossômicas, clastogênicas ou aneugênicas (Figura 20). Adicionalmente, o extrato também não promoveu alteração no índice mitótico (Figura 21), ou seja, não estimulou e nem prejudicou a proliferação celular.

Com base nestes resultados pode-se inferir que o extrato de *Connarus perrottetii* não exibe potencial genotóxico e carcinogênico na máxima concentração testada.

Assim, após análise da toxicidade aguda e do potencial genotóxico, realizou-se o fracionamento do extrato de casca de *Connarus perrottetii*.

Enquanto o extrato bruto da casca foi capaz de inibir tanto a liberação de histamina provocada pelo composto 48/80 (Figura 18B), quanto aquela provocada pelo ionóforo de cálcio (A23187) (Figura 18C), após o fracionamento, o efeito inibidor do extrato foi observado apenas sobre a liberação de histamina provocada pelo composto 48/80. Assim todas as frações analisadas (aquosa, hexânica e de acetato de etila) demonstraram claramente o efeito inibidor da liberação de histamina, porém apenas quando esta foi induzida pelo composto 48/80 (Figuras 23,24 e 25).

Por outro lado, como o efeito inibidor dos extratos sobre a liberação de histamina induzida pelo A23187 não foi observado (Figuras 23C, 24C e 25C), denota-se que os compostos capazes de inibir a secreção de mastócitos nesta condição, não sejam os mesmos implicados na inibição da secreção, quando esta é promovida pelo composto 48/80.

Dado que os efeitos das frações do extrato sobre a secreção de histamina foram diferentes do que foi observado com o extrato bruto, tanto os extratos brutos quanto suas respectivas frações foram submetidos a análise por cromatografia de camada delgada .

A análise por CCD do extrato bruto detectou taninos (figura 22), os quais podem exibir a capacidade de quelar cálcio e, portanto, seriam capazes de interferir com a entrada de cálcio induzida pelo ionóforo A23187 explicando o efeito inibidor do extrato bruto sobre a secreção de mastócito induzida pelo ionóforo.

Entretanto, a diferença encontrada entre o efeito inibitório do extrato bruto (com ambos os estímulos, composto 48/80 e ionóforo) e aqueles das frações (unicamente com o estímulo do composto 48/80) poderia ser devida à presença de substâncias com ação antialérgica (como a cumarina) presentes apenas no extrato bruto, segundo a análise fitoquímica. Assim, essas substâncias mostrariam sua eficácia quando a liberação de histamina se dá com o aumento de cálcio induzido pelo ionóforo.

Outra possibilidade que explicaria a ausência do efeito inibidor das frações do extrato sobre a liberação de histamina provocada pelo ionóforo seria a necessidade de uma ação sinérgica entre constituintes químicos da planta (cumarinas, flavonoides, taninos, terpenos) para produzir um efeito inibitório detectável e significativo.

A análise cromatográfica das frações do extrato de casca de *Connarus perrotetii*, demonstrou agora com mais especificidade a presença de componentes pertencentes a classes químicas detectados na prospecção fitoquímica. Taninos polimerizados (flavan-3-óis) foram detectados na fração aquosa na forma de monômeros de catequinas e ainda, flavonoides estiveram presentes na fração acetato de etila e na fração hexânica (Figura 22).

Todas estas substâncias citadas estão implicadas na ação antialérgica ou anti-inflamatória e possivelmente relacionadas com o efeito inibidor da secreção de mastócitos das frações extrativas de *Connarus perrotetii* sobre a secreção de mastócitos.

Vale destacar que o efeito inibitório na secreção de mastócito foi mais potente com a fração de acetato de etila (Figura 24B). Talvez isso foi por esta apresentar além de catequinas, a marcante presença de flavonoides, compostos com atividade inibidora da secreção, como já discutido anteriormente (da Rocha, et al., 2012; Maeta-Yamamoto et al., 2012. Ambos, catequinas e flavonoides, estariam agindo em sinergismo e promovendo desta forma o forte efeito antissecretor de histamina (Figura 22B)

Como a atividade inibidora da secreção de mastócitos tratados com as frações contendo taninos, foi elevada quando induzida pelo composto 48/80 pode-se inferir que os taninos, incluindo as catequinas, estariam atuando como antagonistas de receptores e/ou bloqueando algum ponto da cascata de sinalização ativada pelo composto.

Nossos resultados, considerados em conjunto, apresentam fortes evidências que apontam para estes compostos como sendo os princípios ativos responsáveis pela ação anti-histamínica de *Connarus perrottetii*.

Em resumo, este trabalho demonstra pela primeira vez o potencial antialérgico de 5 plantas medicinais da Amazônia e das frações daquela que foi a mais potente e não apresentou toxicidade aguda *in vivo* e genotoxicidade *in vitro* (*Connarus perrottetii*). Ainda, alguns dos fitoconstituintes foram apontados como os possíveis responsáveis pelo efeito terapêutico. Embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar e ampliar o conhecimento sobre a atividade terapêutica da planta assim como sobre a avaliação toxicológica dela, este trabalho estabelece o ponto de partida e já apoia o uso terapêutico da *Connarus perrottetii* como extrato com atividade farmacológica comprovada com certo padrão de segurança.

Mediante os nossos resultados, novas bases científicas são formadas para elucidação das informações etnofarmacológicas de plantas tradicionalmente utilizadas na região Amazônica. Em esse contexto, cabe ressaltar a importante contribuição do Horto de Plantas Medicinais da EMBRAPA/Amazônia Oriental como fonte de recursos naturais confiáveis e manejados de forma técnica e racional, o que fornece condições para obtenção de material de qualidade o que propicia a realização de estudos com plantas medicinais da região amazônica, sem causar prejuízo aos recursos naturais da região.

Assim, a possibilidade de investigar alternativas terapêuticas com estes extratos, contra as afeções alérgicas ou condições em que a secreção de mastócitos seja relevante, pode favorecer, sobretudo a populações de baixa renda e que habitam áreas com acesso restrito aos centros de saúde, como muitas vezes ocorre na Amazônia, mas que por outro lado tem acesso direto às plantas medicinais.

6 CONCLUSÕES

-Todos os extratos testados demonstraram atividade inibidora da secreção de histamina, de modo concentração e estímulo dependente.

- A análise fitoquímica qualitativa indicou substâncias presentes nos extratos possivelmente implicadas na ação anti-histamínica: flavonoides, taninos, catequinas, terpenóides e cumarinas.

-Os extratos etanólicos brutos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) foram os que se destacaram por apresentarem potente efeito inibitório sobre a secreção de histamina (e especialmente o extrato da casca).

-A análise da toxicidade aguda do extrato da casca de *C. perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk), mostrou a baixa toxicidade do extrato.

-A análise genotóxica de culturas de linfócitos humanos expostos à máxima concentração usada do extrato da casca de *C. perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk), revelou a ausência de capacidade carcinogênica.

- O extrato etanólico bruto de folhas e de casca de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*(Radlk), bem como suas frações aquosa, hexânica e acetato de etila, possuem alta eficácia na inibição da liberação de histamina de mastócitos porém com diferenças entre os estímulos secretores.

- A análise fitoquímica das frações da *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) por cromatografia de camada delgada apontou substâncias provavelmente responsáveis pelo efeito anti-histamínico da planta: taninos condensados, possivelmente catequinas e flavonoides, que atuariam em sinergismo ou não.

- A alta eficácia dos princípios ativos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk), e a ausência de predisposição tóxica aguda e mutagênica do extrato, sugerem que produtos provenientes desta planta medicinal possam ser potencialmente úteis no tratamento ou prevenção de desordens alérgicas ou outras condições relacionadas a secreção de mastócitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDHARE, R.N.; RAUT, M.K.; NAIK, S.R. Evaluation of antiallergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Sanseveiria trifasciata* leaves (EEST) in rodents. **J Ethnopharmacol.** 142(3):627-33, 2012.

ALENCAR, M.V.O.B. Genotoxicidade e nefrotoxicidade da *Morinda citrifolia* em estudos pré-clínicos: riscos à saúde pública. **R Interd.**6, (1): 1-8, 2013.

BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA, JR. J.O.C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Vero: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18: 544-548, 2008.

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; AZEVEDO JUNIOR, W.F.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; ASTOLFU FILHO, S.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P., SANTOS D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases- A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 100, (6):575-606, 2005.

BEIGUELMAN, B. **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.S. p.32-64, 1982.

BHARDWAJ, A.; BALLAL, S.; VELMURUGAN, N. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citrifolia*, papain and *Aloe vera* (all in gel formulation), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. **ConservDent.** 15, (3): 293-7, 2012.

BIESKI, I.G.; RIOS SANTOS, F.; DE OLIVEIRA, R.M.; ESPINOSA, M.M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U.P.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). **Evid Based Complement Alternat Med.** 2012: 2727,2012.

BONASSI, S.; UGOLINI, D.; KIRSCH-VOLDERS, M.; STROMBERG, U.; VERMRMEULEN, R.; TUCKER, J. D. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 45,(2-3): 258-270, 2005.

BROWN, N.J.R.; ROBERTS II, L.J. Histamine, bradykinin and their antagonists. In: HARDMANM J.G.S.; GILMAN, A.G. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 10 ed. New York: McGraw'Hill: p 645-67, 2010.

CAMPOSTRINI, R.F. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, volume 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010

CARVALHO, M.V.; PENIDO, C.; SIANI, A.C.; VALENTE, L.M.; HENRIQUES, M.G.; Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of *Uncaria guianensis* (Aublet) J. F. Gmelin. **Inflammo pharmacology**. 14, (1-2): 48-56, 2006.

CAVALHER-MACHADO, S.C.; ROSAS, E.C.; BRITO, F.A.; HERINGE, A.P.; DE OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.; FIGUEREDO, M.R.; HENRIQUES, M.D. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **IntImmunopharmacol**. 8, (11):1552-60, 2008.

CHANDRASHEKHAR, V.M.; HALAGALI, K.S.; NIDAVANI, R.B.; SHALAVADI, M.H.; BIRADAR, B.S.; BISWAS, D.; MUCHCHANDI, I.S. Antiallergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **J Ethnopharmacol**. 137, (1): 336-40, 2011.

CHURCH, M.K.; LEVI-SCHAFFER, F. The human mast cell. **J Allergy ClinImmunol**. 99, (2): 155-160, 1997.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **J Ethnopharmacol**.126, (1): 159-175, 2009.

CUNHA, M.C.S. Revisão das espécies do gênero *Luehea* Willd. (Tiliaceae), ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro. **Sellowia**. 37: 5-41. 1985

DEBROSSE.,C.W.; ROTHENBERG.M.E.Chapter 5: Inflammatory Effector Cells/Cell MigrationPediatric Allergy: **Principles and Practice (Second Edition)**,2010.

DE OLIVEIRA, D.M.; LUCHINI A.C.; SEITO, L.N.; GOMES, J.C.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DI STASI, LC. *Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species. **J Ethnopharmacol**.135, (2): 463-8, 2011.

DE SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.; ELISABERSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J Ethnopharmacol**. 90, (1): 135-43, 2004.

DEVIA, B.; LLABRES, G.; WOUTERS, J.; DUPONT, L.; ESCRIBANO-BAILON, M.T.; ANGENOT, L.; TIST, M. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica*.**Phytochem Analysis**. 13: 114-120, 2002.

DOS SANTOS, V.C.; LONGO, T.B., GARCIA, A.L., RICHTER, M.F., GUECHEVA, T.N., HENRIQUES, J.A.; FERRAZ, A.D.E. B.; PICADA ,J.N. Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica*Verlot (Bignoneaceae), an Amazon plant with medicinal properties. **JToxicol Environ Health A**. 76, (6): 381-9,2013.

FELÍCIO, L.P.; SILVA, E.M.; RIBEIRO, V.; MIRANDA, C.T.; VIEIRA, I.L.; PASSOS, D.C.; FERREIRA, A.K.; VALE, C.R.; LIMA, D.C.; CARVALHO, S.; NUNES, W.B. Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing. **Genet Mol Res**. 10, (1):16-24, 2011.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**.455, (1-2): 81–95, 2000.

FERREIRA, M.G. R.; GONÇALVES, E. P. Efeito do número de nós sobre o crescimento inicial de plantas de crajiru (*Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl.). **Embrapa Rondônia Circular Técnica**, 99. Porto Velho: Embrapa Rondônia. 4p. il. Color, 2007.

FERREIRA, M.G. R.; GONÇALVES, E. P. Tipo de estacas e crescimento de cipó-alho (*Mansoa alliacea*) A. Gentry. **Embrapa Rondônia Circular Técnica**, 98. Porto Velho: Embrapa Rondônia. 4 p. il. Color, 2007.

FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GOMES, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamm Res.** 45: 442-447, 1996.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Org). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da UNESP. p. 129-156, 1996.

FORERO, E.; KAMINO, L. H. Y. Connaraceae In: **LISTA de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB082007>. Acesso em: 22 dez. 2012.*

GIANNOTTI, E.; VANDIN, L.; REPETO, P.; COMELLI, R.; A comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. **Mutagenesis.** 17, (2):163-70, 2000.

GOMES, J.C.; DI STASI, L.C.; SGARBOSA, F.; BARATA, L.E.S. Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchietia salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. **Int. Arch. AllergyImmunol.**, 103:188-193, 1994.

GOMES J.C.; DE OLIVEIRA, D.M. Histamina e seus antagonistas e fármacos antialérgicos In: DI STASI, L.C.; BARROS, C.M. **Farmacologia Veterinária**. Barueri, SP: Manole. p. 180-93, 2012.

GONZALEZ, F.G.; DI STASI, L. C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbran diaebracteata* in mice. **Phytomedicine**. 9: 125-134, 2002

Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, 2011.

GUPTA R.K.; BANERJE, A.; PATHAK S.; SHARMA C.; SINGH, N. Induction of mitochondrial-mediated apoptosis by *Morinda citrifolia* (Noni) in human cervical cancer cells. **AsianPac J Cancer Prev**. 14, (1):237-42, 2013.

GUS, R. Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética In: MALUF, S.W. et al. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed. p. 63-69, 2011.

HAN EH, PARK JH, KIM JY, CHUNG YC, JEONG HG. Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. **Food Chem Toxicol**. 47(6):1069-75, 2009.

IUCN, W.H.O and W.W.F. **Guidelines on the conservation of medicinal plants**. IUCN. Gland, Switzerland. 1993.

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S.J. New developments in mast cell biology. **Natural Immunology**. 9: 1215–1223, 2008.

KIM, H.H.; KIM, D.S.; KIM, S.W.; LIM, S.H.; KIM, D.K.; SHIN, T.Y.; KIM, S.H. Inhibitory effects of *Diospyros kaki* in a model of allergic inflammation: role of cAMP, calcium and nuclear factor- κ B. **Int J Mol Med**. 32(4):945-51, 2013.

KIM, S.H.; CHOI, C.H.; KIM, S.Y.; EUN, J.S.; SHIN, T.Y. Anti-allergic effects of *Artemisa iwayomogi* on mast cell-mediated allergy model. **ExpBiol Med.** 230 (1) :82-88,2005.

Knudsen T: The Na⁺/K⁺ATPase-pump in rat peritoneal mast cells: some aspects of regulation of activity and cellular function. *Dan Med Bull* 42: 441–454, 1995.

KO HH, HUNG CF, WANG JP, LIN CN. Antiinflammatorytriterpenoids and steroids from Ganodermalucidum and G. tsugae. **Phytochemistry.** 69(1):234-9,2008.

LAGO, J.; ALFONSO, A.; VIEYTES, M.R.; BOTANA L.M. Ouabain-induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by protein phosphorylation and intracellular pH. **Cell Signal.** 13(7):515-24, 2001.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular.** Embrapa Amazônia Oriental. 264p, 2008.

LAZUTKA, J.R.; LEKEVICIUS, R.; DEDONYTE, V.,; MACIULEVICIUTE-GERVERS, L.; MIERAUSKIENE, J.; RUDAITIENE, S.; SLAPSYTE, G. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures. **Mutat Res.** 445, (2): 225-39, 1999.

LEE, A.; THOMSON, J. Reações cutâneas induzidas por fármacos. In: **Reações adversas a medicamentos**, 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed. 488p, 2009.

LOPES, J.L.C. Cromatografia de camada delgada. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Coords.). **Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas: Editora Unicamp, p 45-48, 1990.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F. PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. **Quim Nova.** 25, (3): 429-438, 2002.

MAKINO H.; SAIJO T, ASHIDA Y, KURIKI H AND MAKI Y: Mechanism of action of an antiallergic agent, amlexanox (AA-673), in inhibiting histamine release from mast cells. Acceleration of cAMP generation and inhibition of phosphodiesterase. **Int Arch Allergy Appl Immunol.**82:66–71. 1987.

MANCEL, E.; DROUET, M.; SABBAH, A. Membrane stabilizers. **Allergy Immunol.**31: 103-105, 1999.

MARQUES, T. P. Subsídios à Recuperação de Formações Florestais Ripárias da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná, a Partir do Uso Espécies Fontes de Produtos Florestais Não-madeiráveis. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie.**88, (11): 1515-1531, 2006.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cell. **Physiol Rev.** 77, (4): 1033-1079, 1997.

METCALFE, D.D.; BOYCE, J.A. Mast cell biology in evolution. **J Allergy Clin Immunol.** 117: 1227-1229, 2006.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS.2008.

OKUSADA, K.; NAKAMOTO K.; NISHIDA M.; FUJITA-HAMABE W.; KAMIYA, K.; MIZUSHINA Y.; SATAKE T.; TOKUYAMA, S. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCl₃-soluble phase and its main active component, damnacanthal, isolated from the root of *Morinda citrifolia*. **BiolPharm Bull.** 34, (1): 103-7, 2011.

OLIVEIRA, D.P.C; BORRÁS, M.R.L.; FERREIRA, L.C.L.; LÓPES-LOZANO, J.L. Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. ver **Braz J Pharmacogn.** 19(2b): Abr./Jun. 2009.

OSKERITZIAN, C.A.; ZHAO, W.; MIN, H.K.; XIA, H.Z.; POZEZ, A.; KIEV, J.; SCHWARTZ, L.B. Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. **J Allergy Clin Immunol.** 115, (6):1162-8, 2005.

PARACAMPO, N.E.N.P. *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. (Connaraceae): tradicionalmente utilizada como barbatimão no Pará. **Documentos/Embrapa Amazônia Oriental**,n:376: 45p, 2011.

PASSOS, G.F.; FERNADES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J Ethnopharmacol.** 110, 323–333, 2007.

PEARCE, F.L.; BEFUS A.D.; BIENENSTOCK, J. Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. **J Allergy Clin Immunol.** 73(6):819-23, 1984.

PIANOWSKY, L.F. *Cordia verbenacea*: planta contra a inflamação. **J Phytom.**n. 5, p.1-3, 2005.

RAKESH, S.; SAHOO, H.B. Evaluation of antiasthmatic activity of ethanolic extract of *Elephantopus scaber* L. leaves. **Indian J Pharmacol.** 44, (3): p. 398–401, 2012.

RIVERA, J.; GILFILLAN, A.M. Molecular regulation of mast cell activation. **J Allergy Clin Immunol.** 117, (6): 1214-1225, 2006.

ROLDÃO, E.F.; WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; DISTASI, L.C. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **J Ethnopharmacol.** 119,94–98, 2008.

ROMAN, A. L. C.; SANTOS, J. U. M. A importância das plantas medicinais para a comunidade pesqueira de Algodual. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Naturais.**1, n. (1): 69-80, 2006.

ROSARIO-FILHO NA, JACOB CM, SOLE D, CONDINO-NETO A, ARRUDA LK, COSTA-CARVALHO B, COCCO RR, CAMELO-NUNES I, CHONG-NETO HJ, WANDALSEN GF, CASTRO AP, YANG AC, PASTORINO AC, SARINHO ES. Pediatric allergy and immunology in Brazil. **Pediatr Allergy Immunol.** 24(4):402-9, 2013.

SAGAR, R.; SAHOO H.B. Evaluation of antiasthmatic activity of ethanolic extract of *Elephantopus scaber* L. leaves. **Indian J Pharmacol.** 44, (3): 398-401, 2012.

SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G.; DOS SANTOS, J.P.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, A.D.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; DE LIMA NOGUEIRA, P.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; DE SOUZA ARAÚJO, A.A. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Med Food.** 14, (10): p. 1159-66, 2011.

SERTIÉ, J.A.A.; WOISKY, R.G.; WIEZEL, G.; RODRIGUES, M. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine,** 12: 338-344, 2005.

SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; COHN, J.R. V.H.A method for the fluometric assay of histamine in tissues. **JPharmacol.Exp. Ther.,** 127:182-190, 1959.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre. 2003.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**, 6^o ed.

UFSC., Florianópolis.315p,2010.

SINGH,B.; NADKARNI,J.R.; VISHWAKARMA,R.A.; BHARATE,S.B.; NIVSARKAR,M.; ANANDJIWALA,S.The hydroalcoholic extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves and its major compound rhein exhib its anti allergic activity via mast cell stabilization and lipoxygenase inhibition. **J Ethnopharmacol.** 141 (1): p.469-73, 2012.

SINGLETON, V. L; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.**MethodsEnzymol.** 299: 152–178, 1999.

SIRIGANIAN, R.P. An automated continuous-flow system for the extractions and fluorometric analysis of histamine.**Anal.Biochem.** 57: 383-394, 1974.

SOARES DE MOURA, R.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; NACIMENTO DA SILVA, V.; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUBENICHE, L.M.; ARAÚJO, R.J.; CARVALHO, L.C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **J Ethnopharmacol.**, 54 (2): 249-256, 2002.

SOUZA FILHO, A.P. da S.; NASCIMENTO, J.L.M. **Cipó-de-alho: aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas.** EMBRAPA Amazônia Oriental.165p, 2012.

SRÁM, R.J.; PODRAZILOVÁ, K.; DEJMEK, J.; MRACKOVÁ, G.; PILCIK, T. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. **Mutagenesis.** 13, (1): 99-103, 1998.

STEAGALL, P.V.M.; ROCHA, N.P. Farmacologia dos anti-inflamatórios não esteroidais e antipiréticos-analgésicos In: DI STASI L.C.; BARROS, C.M. **Farmacologia Veterinária.** Barueri, SP: Manole. p 210-212, 2012.

TAMURA, S.; YOSHIHARA, K.; FUJIWARA, K.; MURAKAMI, N. New inhibitors for expression of IgE receptor on human mast cell. **Bioorg Med Chem Lett**. 20(7):2299-302, 2010.

TICE, R. R. et al. Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. **Mutation Research**. Iowa, 312,(3): 305-312, jun. 2000.

TOKURA, T.; NAKANO, N.; ITO, T.; MATSUDA, H.; NAGASAKO-AKAZOME, Y.; KANDA, T.; IKEDA, M.; OKUMURA K.; OGAWA, H.; NISHIYAMA, C. Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcεRI. **Biosci Biotechnol Biochem**. 69(10):1974-7, 2005.

VAN DEN BERG, M.E. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 207p., 1993.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia na Amazônia: manual de plantas medicinais. A farmácia de Deus**, 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 347p. 1992

WANG, M.Y.; WEST B.J.; JENSEN, C.J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A.K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**. 23, (12): 1127-41, Dez. 2002.

ZAPPI, D. 2013. *Morinda* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24493>)

WENG, Z.; ZHANG, B.; ASADI, S.; SISMANOPOULOS, N.; BUTCHER, A.; FU X, KATSAROU-KATSARI A., ANTONIOU, C.; THEOHARIDES, T.C. Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. **PLoS One**. 7(3): e33805, 2012.

YAMAURA, K.; ISHIWATARI, M.; YAMAMOTO, M.; SHIMADA M.; BI Y. UENO, K. Anthocyanins, but not anthocyanidins, from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.)

alleviate pruritus via inhibition of mast cell degranulation.**J Food Sci.** 77(12):H262-7, 2012.

ZHANG H.; LI, J.; XIA J.; LIN S. Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis*.**Int J Biol Macromol.** 58: 7-12, 2013.