



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
*CAMPUS MACAÉ*  
CURSO DE FARMÁCIA



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIALÉRGICA DE ESPÉCIES VEGETAIS  
*PASSIFLORA MUCRONATA E VITEX POLYGAMA*, PROVENIENTES DA  
RESTINGA DE JURUBATIBA (MACAÉ)

MARIANA AZEVEDO BARROS

MACAÉ  
JUNHO DE 2015

MARIANA AZEVEDO BARROS

Título: Estudo da Atividade Antialérgica de Espécies Vegetais *Passiflora mucronata* e *Vitex polygama*, Provenientes da Restinga de Jurubatiba (Macaé).

Trabalho de Conclusão de Curso Apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine dos Anjos da Cruz

Macaé  
Junho de 2015

Barros, Mariana Azevedo

Estudo da Atividade Antialérgica de Espécies Vegetais  
*Passiflora mucronata* e *Vitex polygama*, Povenientes da Restinga de  
Jurubatiba (Macaé)/ Macaé, RJ, 2015.

Orientador: Elaine dos Anjos da Cruz

50 páginas

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal  
do Rio de Janeiro

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me acompanhar em cada caminhada, sendo fonte de força e conforto, mostrando que a fé é a base de qualquer vitória.

Aos meus amados pais, que são meus exemplos de determinação e caráter, agradeço pelo amor incondicional, por serem meu porto seguro e inspiração, por toda proteção e cuidado, pela paciência e palavras de motivação, pelo incentivo nos momentos difíceis, e por estarem sempre ao meu lado. À vocês, dedico toda minha conquista e amor.

À toda minha família, agradeço pelos momentos compartilhados, por serem sempre presentes em meus dias, dividindo carinhos, risadas, companheirismo e afeto. Obrigada por me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos meus grandes amigos, que tornam minha caminhada mais leve e divertida, obrigada por todo amor, cumplicidade e histórias vividas.

Às minhas colegas de laboratório, agradeço a ajuda durante todo esse tempo, a boa companhia e aos momentos de descontração.

À minha Orientadora, pelos ensinamentos, incentivo, dedicação, atenção e amizade.

À FUNEMAC pelo apoio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Passiflora mucronata</i>	20
<b>Figura 2</b>	<i>Vitex polygama</i>	22
<b>Figura 3</b>	Obtenção do extrato bruto e frações químicas das espécies vegetais	26
<b>Figura 4</b>	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de <i>P. mucronata</i> e <i>V. polygama</i> sobre macrófagos	32
<b>Figura 5</b>	Avaliação da atividade do extrato bruto de <i>P. mucronata</i> sobre a inibição da desgranulação de mastócitos	34
<b>Figura 6</b>	Avaliação da atividade do extrato bruto de <i>V. polygama</i> sobre a inibição da desgranulação de mastócitos	36
<b>Figura 7</b>	Avaliação da atividade dos extratos vegetais de <i>P. mucronata</i> e <i>V. polygama</i> sobre a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos.	38
<b>Figura 8</b>	Avaliação da atividade das frações acetato de etila de <i>P. mucronata</i> e acetato de etila e butanólico de <i>V. polygama</i> sobre a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos.	40

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Moléculas-chaves liberadas após estímulo antigênico e sua atuação em células efectoras primárias	11
<b>Quadro 2</b>	Mediadores inflamatórios e suas funções	14
<b>Quadro 3</b>	Espécies vegetais selecionadas. Código botânico (exsicata); partes utilizadas; tipo de extrato e códigos estabelecidos	25

## Lista de Abreviações e Siglas

- AMPc:** Monofosfato Cíclico de Adenosina
- ANOVA:** Análise de Variância
- BSA:** Albumina de soro bovino
- CTLA-4:** Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
- CD40:** *cluster* de diferenciação 40, receptor coestimulador de CD40 ligante
- DMEM:** Meio essencial mínimo de Dulbecco
- DNP:** Dinitrofenol
- D.O:** Densidade Óptica
- ELISA:** Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FAP:** Fator de Ativação Plaquetária
- FCeRI:** Receptor de Alta Afinidade Para Imunoglobulina E
- FcYRII e FcYRIII:** Receptor de Alta afinidade para Imunoglobulina G
- FMS:** Fenasina Metosulfato
- GM-CSF:** Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- H1:** Receptor de Histamina 1
- H2:** Receptor de Histamina 2
- H3:** Receptor de Histamina 3
- H4:** Receptor de Histamina 4
- HRP:** *Horseradish peroxidase*
- IL-:** Interleucina
- IgE:** Imunoglobulina E
- IgG:** Imunoglobulina G
- LDH:** Enzima Lactato Desidrogenase
- LTC4:** Leucotrieno C4
- MHC:** Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NAD:** Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
- PBS:** *Phosphate buffered saline*
- T CD4+:** Marcador do Linfócito T Auxiliar
- TH2:** T *helper* 2
- TNF-:** Fator de Necrose Tumoral
- TGF-β:** Fator de Transformação do Crescimento-β
- VEGF:** Fator de Crescimento Vascular Endotelial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1. O Processo Alérgico e a Importância dos Mastócitos .....	10
1.2. Os Mediadores Inflamatórios e a Histamina.....	14
1.3. A busca de Novas Substâncias para Tratamento de Alergias.....	18
1.4. Espécies Vegetais Seleccionadas .....	20
1.4.1. <i>Passiflora mucronata</i> .....	20
1.4.2. <i>Vitex polygama</i> .....	21
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Objetivos Gerais.....	23
3.2. Objetivos Específicos .....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. Materiais utilizados.....	24
4.1.1. Animais .....	24
4.1.2. Coleta das Espécies Vegetais .....	24
4.1.3. Preparo dos Extratos Brutos e Frações de <i>Passiflora mucronata</i> e <i>Vitex polygama</i> .....	25
4.2. Metodologia realizada.....	26
4.2.1. Ensaio de Citotoxicidez em Macrófagos .....	26
4.2.1.1. Isolamento e cultura de macrófagos peritoneais de rato.....	26
4.2.1.2. Preparo do Ensaio de Citotoxicidez.....	27
4.2.1.3. Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH) .....	27
4.2.2. Ensaio da Desgranulação de Mastócitos .....	28
4.2.3. Ensaio da Liberação de Histamina .....	28
4.2.3.1 Isolamento de Mastócitos Peritoneais de Rato .....	28
4.2.3.2 Tratamento dos Mastócitos com os Extratos Vegetais Brutos e suas Frações.....	29
4.2.3.3. Dosagem de Histamina por ELISA competitivo .....	30
4.3. Análise Estatística .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1. Avaliação da Citotoxicidez dos Extratos em Macrófagos <i>in vitro</i> .....	30

5.2. Atividade Inibitória dos Extratos Brutos de <i>P. mucronata</i> e <i>V. polygama</i> Sobre a Desgranulação de Mastócitos .....	32
5.3. Avaliação da Atividade dos Extratos e sua Frações sobre a Inibição da Liberação de Histamina .....	36
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>



## RESUMO

A reação de hipersensibilidade imediata do tipo I é dependente de anticorpos do tipo IgE, tendo o mastócito como célula efetora central por possuírem em sua superfície receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI), e citoplasma repleto de grânulos contendo mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, a histamina. A ligação do antígeno ao anticorpo IgE leva a desgranulação do mastócito e liberação dos mediadores, desencadeando a resposta alérgica inflamatória. O presente estudo tem como objetivo investigar a atividade antialérgica dos extratos de *Passiflora mucronata* e *Vitex polygama*. Para isso, realizou-se o ensaio da desgranulação de mastócitos em membranas de mesentérios de ratos Wistar, incubadas *ex-vivo* com anticorpo IgEαDNP. Os extratos etanólicos brutos de folhas das espécies vegetais *Passiflora mucronata* e *Vitex polygama*, foram avaliados nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL. O flavonoide quercetina (0,1 mg/ml) foi utilizado como padrão de substância natural com atividade inibitória sobre a desgranulação de mastócitos, já comprovada. Desafiou-se os grupos com o antígeno DNP e os mastócitos desgranulados e intactos foram contabilizados em microscópio óptico. Os extratos brutos das espécies, e as frações em acetato de *P. mucronata*, acetato e butanólica de *V. polygama* foram avaliados também quanto sua capacidade inibitória sobre a liberação de histamina, utilizando cultura de mastócitos peritoneais de ratos Wistar, sensibilizados com anticorpo IgEαDNP e tratados com 0,5 mg/mL do extrato e 0,1 mg/mL das frações. Fez-se o desafio com antígeno DNP e o sobrenadante da cultura de células foi coletado para a detecção de histamina pela técnica ELISA competitivo. Quanto à inibição da desgranulação mastocitária *ex vivo*, observou-se para os extratos de *V. polygama* que, quando comparadas ao grupo controle positivo de desgranulação (94,5% de células desgranuladas), houve uma inibição significativamente estatística para todas as concentrações testadas de forma não dependente da concentração, sendo de  $1,5 \pm 0,71$ ,  $2,5 \pm 0,71$  e  $8 \pm 2,83$ , respectivamente. Para os extratos brutos de *P. mucronata*, verificou-se que, quando comparadas ao grupo controle (95  $\pm$  1,41% de mastócitos desgranulados), as concentrações 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL foram capazes de inibir a desgranulação mastocitária sendo o percentual de mastócitos desgranulados igual a  $3,5 \pm 0,71$ ,  $12,5 \pm 0,71$  e  $30,5 \pm 2,21$ , respectivamente, sendo o efeito concentração dependente. Além disso, os extratos de *P. mucronata* e *V. polygama* foram capazes de inibir significativamente a liberação de histamina *in vitro* quando comparados aos grupos controles composto 48/80 ( $81,21 \pm 0,2$  ng/mL) e IgEαDNP ( $82,68 \pm 0,4$  ng/mL), sendo de  $6,66 \pm 0,1$  ng/mL e  $12,6 \pm 2,8$  ng/mL, respectivamente. A fração acetato de *p.mucronata* apresentou  $3,96 \pm 1,1$  ng/mL, enquanto as frações em acetato e butanol de *V.polygama* apresentaram  $6,6 \pm 0,9$  ng/mL e  $9,7 \pm 0,6$  ng/mL, respectivamente. Valores bem inferiores aos apresentados pelos grupos controle composto 48/80 ( $72,68\% \pm 0,6$  ng/mL) e IgEαDNP ( $72,68\% \pm 0,6$  ng/mL), indicando a potente ação das frações sobre a liberação de histamina. Desta forma, conclui-se que ambos os extratos estudados foram capazes de inibir a desgranulação dos mastócitos, e também a liberação de histamina, bem como suas respectivas frações. O que pode estar associado a uma possível atividade antialérgica com promissora utilização terapêutica futura.

**Palavras Chaves:** Mastócitos, Hipersensibilidade tipo I, Histamina.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Processo Alérgico e a Importância dos Mastócitos

As respostas imunes exacerbadas contra diferentes antígenos são responsáveis por uma variedade de doenças humanas, dentre elas a hipersensibilidade imediata ou reação alérgica. A inflamação alérgica é um processo complexo que envolve diversos tipos celulares, incluindo células dendríticas, linfócitos, mastócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos, que irão produzir uma série de mediadores inflamatórios, como lipídeos, purinas, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio que irão manter a resposta inflamatória (BARNES, 2011).

Na resposta alérgica inflamatória, as células dendríticas, principais células apresentadoras de antígenos, absorvem e processam um antígeno alergênico na forma de pequenos fragmentos peptídicos, os quais serão apresentados, através de moléculas MHC de classe II, às células T CD4<sup>+</sup> virgens, que adquirem um padrão de linfócitos T auxiliares do tipo 2 ( ou T *helper* 2, T<sub>H2</sub>), secretando principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que são fundamentais para a síntese de anticorpo IgE, além de promoverem a diferenciação e ativação de eosinófilos e linfócitos T, e amplificar a resposta alérgica em uma fase tardia. (PRUSSIN e METCALFE, 2013).

Quando ativadas, as células T<sub>H2</sub> determinam a expressão de CD40 ligante e produção das interleucinas IL-4 e IL-13. A ligação destas citocinas e do ligante às células B provocam sua ativação, induzindo essas células a promoverem a troca de fenótipo de anticorpo IgG para IgE (STONE *et al.*, 2010). Outra fonte de produção das interleucinas IL-4 e IL-13 são os mastócitos, basófilos e células epiteliais, que também são capazes de liberar grande quantidade dessas citocinas (SCHROEDER *et al.*, 2009).

Uma vez produzidas, as moléculas de IgE se ligam à receptores de alta afinidade (FcεRI) presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, causando a sensibilização dessas células para um alérgeno específico, além de estimular o aumento da expressão desses receptores na superfície. A exposição subsequente ao mesmo antígeno multivalente leva ao intercruzamento dos receptores FcεRI, ativando uma série de eventos intracelulares que irão culminar na liberação de

citocinas e mediadores pro-inflamatórios, caracterizando as manifestações clínicas da alergia (YOO *et al.*, 2012). Após estímulo antigênico, moléculas chaves na resposta inflamatória são liberadas na corrente sanguínea onde exercerão diferentes funções (Quadro 1), atuando em células efetoras do sistema imune e assim modulando a resposta alérgica.

**Quadro 1:** Moléculas chaves liberadas após estímulo antigênico e sua atuação em células efetoras primárias (Adaptado de SHAO-HENG *et al.*, 2013). Molécula

Molécula	Célula Secretora	Papel na Resposta Alérgica
Imunoglobulina IgE	Células B	Se liga à receptores de alta afinidade FCRI, sensibilizando mastócitos e basófilos, que quando ativados leva a liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, iniciando as manifestações clínica da alergia.
Citocina TSLP	Basófilos, Mastócitos, Células Dendríticas	Promove ativação de células T <sub>H2</sub> , mastócitos, células dendríticas, eosinófilos e basófilos, desencadeando o processo inflamatório.
IL-3	Mastócitos, Linfócitos T	Provoca liberação de histamina , LTC <sub>4</sub> , IL - 4 e IL -13, estimulando a expansão de basófilos e mastócitos.
IL-4, IL-13	Mastócitos, Basófilos, Células Epiteliais e T <sub>H2</sub>	Estimulo crucial para produção de IgE a partir de células B.
IL-5	Mastócitos, Basófilos, Eosinófilos, Células T <sub>H2</sub>	Envolvido na diferenciação, maturação, migração, desenvolvimento, sobrevivência, tráfico e função de eosinófilos.
IL-17	Basófilos, Eosinófilos, Mastócitos, Células Epiteliais	Reforça a produção de citocinas T <sub>H2</sub> ; ativação de células T <sub>H2</sub> , mastócitos células dendríticas, basófilos e eosinófilos, levando a inflamação alérgica.
IL-33	Células Epiteliais	induz a liberação de citocinas T <sub>H2</sub> por mastócitos, estimula a produção nos basófilos de IL - 1beta , IL - 4 , IL - 5 , IL - 6 , IL - 8 , IL -13 , e GM-CSF, atuando como um molécula central na asma alérgica através de estímulos gerados em basófilos, mastócitos, eosinófilos e células T <sub>H2</sub> .
GM-CSF	Mastócitos, Basófilos, Eosinófilos, Células T <sub>H2</sub>	Induz a liberação de IL-4 a partir de mastócitos e estimula a proliferação e diferenciação de eosinófilos na medula óssea, além da quimiotaxia e ativação dessas células.

Dentre as células efetoras principais da alergia encontram-se os mastócitos. Descritos pela primeira vez em 1978 por Paul Ehrlich (METCALFE *et al.*, 1997), essas células derivam-se de progenitores multipotentes hematopoiético, e sofrem diferenciação sob a influência do fator de células tronco (*stem cell factor* – SCF) e da interleucina 3 (IL-3) (GOLKAR e BERNHARD, 1997). Após diferenciação na medula óssea, migram pelo sangue e sistema linfático para os tecidos periféricos, onde amadurecem, passando a apresentar um citoplasma repleto de grânulos que se coram metacromaticamente por corantes básicos, como o azul de toluidina (GILFILLAN *et al.*, 2012). Os mastócitos são encontrados principalmente na pele e mucosas, sendo derivados das células mesenquimatosas circulantes no sangue e linfa (ARAÚJO, 2013). Sua maturação é altamente dependente dos fatores microambientais produzidos pelos tecidos nos quais eles residem. (METCALFE *et al.*, 1997).

A ativação dos mastócitos pode ocorrer tanto por mecanismos imunológicos, dependentes de IgE, como não imunológicos. Na reação de hipersensibilidade imediata tipo I, a ativação é decorrente de estímulos imunológicos, através da ativação de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI), localizados na superfície dessas células. Tais receptores desempenham papéis importantes na fisiologia dos mastócitos podendo atuar na sua ativação, maturação e proliferação (IBIAPINA, 2008).

Neste mecanismo de ativação, a estimulação ocorre através da interação de um alérgeno à molécula de IgE, que irá se ligar aos mastócitos através de receptores FcεRI, sensibilizando essas células. Quando há uma segunda exposição a esse mesmo alérgeno, este se ligará a IgE presente na superfície dos mastócitos, levando a formação do complexo antígeno-anticorpo-FcεRI, e ativação dos mastócitos com subseqüente reações bioquímicas em cascata. Isso levará ao aumento do cálcio intracelular e despendimento de energia metabólica, culminando na desgranulação mastocitária (GOMES e DE OLIVEIRA, 2012).

Já a ativação não imunológica da desgranulação mastocitária ocorre através de sinalização de receptores de superfície celular de baixa afinidade para IgG (FcγRII e FcγRIII) (WEDEMEYER e GALLI, 2000), por meio de estímulos químicos, como toxinas, venenos, alcaloides, aminas e outras droga, estímulos físicos, ou extremos de temperatura e pH (FERRY *et al.*, 2001). Outros potentes estimuladores

da ativação dos mastócitos são o composto 48/80, carreadores de cálcio e ionóforos, sendo, portanto muito utilizados em estudos experimentais da resposta alérgica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Tais estímulos irão interagir de diferentes formas com a superfície dos mastócitos, atuando na ativação celular tanto por mecanismos citotóxicos (lise celular) como não citotóxicos. Essas vias adicionais de ativação são importantes em reações não-imunomediadas ou no aumento das reações mediadas pela IgE (ABBAS *et al.*, 2000).

Independente do estímulo, a desgranulação dos mastócitos ocorre devido ao aumento das concentrações de cálcio intracelular, tanto pela mobilização dos depósitos de cálcio intracelulares como também por aumentar a permeabilidade da membrana plasmática ao cálcio externo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Algumas moléculas como as fosfolipases, proteína quinase C, calmodulina e adenilato ciclase estão envolvidas no aumento das concentrações intracelulares de cálcio, principalmente por controlar os níveis de AMPc (KIM *et al.*, 2006).

Os mastócitos são considerados uma das maiores fontes de mediadores químicos no organismo, sendo responsáveis pela liberação de inúmeros produtos farmacologicamente ativos, tais como: a) Fatores pré-formados: histamina, heparina, B-hexosaminidase, proteoglicanos e algumas citocinas (por exemplo o TNF- $\alpha$  -fator de necrose tumoral alfa), que participam dos processos imunológicos e diversos outros processos biológicos, b) Fatores neo-formados: responsáveis pelo processo inflamatório, como os derivados do ácido aracídico (Prostaglandinas D2), leucotrienos e tromboxanos. c) Fatores neo-sintetizados: interleucinas (IL-3,IL-4,IL-5 e IL-6) e fatores quimiotáticos, recrutando outras células de defesa para o local da inflamação (DVORAK, 2005 e GALLI, 2000).

Após liberados, os mediadores inflamatórios irão atuar sobre diferentes órgãos, exercendo assim diferentes funções. Tais mediadores podem também ser classificados como mediadores primários ou mediadores secundários (Quadro 2). Sendo os primários produzidos antes da desgranulação e armazenados nos grânulos. Enquanto os mediadores secundários são sintetizados após a ativação da célula-alvo, liberados pela degradação dos fosfolipídeos de membrana, durante o processo de desgranulação (GOMES e DE OLIVEIRA, 2012).

**Quadro 2:** Mediadores inflamatórios e suas funções (Adaptado de GOMES e DE OLIVEIRA, 2012).

Mediadores Primários	Mediadores Secundários
Histamina: Vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, broncoconstrição e aumento da secreção da mucosa	Leucotrienos C <sub>4</sub> + D <sub>4</sub> + E <sub>4</sub> : Substância de reação lenta anafilática
Heparina: Ação anticoagulante	Prostaglandinas D <sub>2</sub> : Ação vasodilatadora
Cimino genase: produção de cininas, vasodilatadoras – bradicinina	Prostaglandinas E1 e E2: Ação vasodilatadora e broncodilatadora
FQA-A: Fator de quimiotaxia de eosinófilos	Prostaglandina I <sub>2</sub> : Proteção vascular, através de ação antia-gregante plaquetária
FQE-PMN: Fator de quimiotaxia de polimorfonucleares	Prostaglandina 1a: Ação broncoconstritora
FAP: Fator de ativação de plaquetas	Tromboxano A <sub>2</sub> e B <sub>2</sub> : Atividade agregante plaquetária
Tripsase: Ação proteolítica, ativação de C3	

Na Hipersensibilidade Tipo I, a localização e severidade com que a doença irá ocorrer dependerão da localização e número de mastócitos que serão estimulados, podendo ser uma reação local ou sistêmica. Essa estimulação é dependente de diversos fatores, como o grau de sensibilidade do indivíduo, a quantidade de antígenos envolvidos e a porta de entrada do alérgeno, que pode ser por ingestão, subcutânea ou inalação, sendo esta última a mais comum. (BROWN *et al.*, 2002).

## 1.2. Os Mediadores Inflamatórios e a Histamina

A reação alérgica possui, geralmente, duas fases bem definidas, sendo uma resposta inicial e uma fase tardia. A resposta inicial ocorre poucos segundos após a estimulação antigênica, e caracteriza-se pelo rápido aumento da permeabilidade vascular e espasmo do músculo liso, sendo a histamina o principal mediador envolvido nesta fase (WEDEMEYER E GALLI, 2000). Já a fase tardia ocorre entre

duas a oito horas após a estimulação ao alérgeno, se mantendo por vários dias (GALLI, 2000). Nesta fase, o processo inflamatório é causado pela síntese e liberação de diversos componentes, como os leucotrienos, quimiocinas e citocinas pelos mastócitos ativados, que são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos, principalmente os linfócitos TH2, eosinófilos e basófilos. Caso o estímulo persista, a resposta tardia se converte em uma resposta inflamatória crônica pela estimulação das células TH2 (JANEWAY *et al.*, 2001).

Dentre os mediadores pró-inflamatórios, a histamina é um componente fundamental na resposta alérgica, sendo liberada na corrente sanguínea após a desgranulação dos mastócitos, compondo aproximadamente 10% do volume total dessas células, constituindo assim, o principal reservatório de histamina no organismo animal. Assim, sua concentração no organismo, bem como sua disposição acompanha a distribuição de mastócitos, onde tecidos e fluidos ricos dessas células, como pele, camada mucosa do Trato Gastrointestinal, pulmões e vias aéreas superiores e fluidos peritoneais de ratos e camundongos, possuem elevadas concentrações de histamina. Além disso, podem ser encontradas em basófilos circulantes na corrente sanguínea (GOMES e DE OLIVEIRA, 2012).

Após liberada, a histamina atuará em seus receptores específicos, que podem ser classificados em quatro grupos, os receptores H1, H2, H3 e H4, diferindo entre si pela sua expressão, transdução de sinal e função. Todos os receptores histamínicos pertencem à superfamília de receptores acoplados a uma proteína G (GOMES e DE OLIVEIRA, 2012). O receptor de proteína G na posição H1, codificado pelo cromossoma 3, é responsável por diversos sintomas de doenças alérgicas, como rinorréia, broncoconstrição e contração da musculatura gastrointestinal (IBIAPINA *et al.*, 2008).

Os receptores H1 são encontrados em uma variedade de tecidos, células neurais, músculo liso vascular e vias aéreas, endotélio, hepatócitos, células epiteliais, neutrófilos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, linfócitos B e T. Sua ativação estimula as vias sinalizadoras de inositol, culminando na formação do inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) e do diacilglicerol (DAG), levando ao aumento do cálcio intracelular. Além disso, a estimulação dos receptores H1 podem levar à ativação de diversas vias de sinalização, como a via da fosfolipase D e a da fosfolipase A, podendo levar também a ativação do fator de transcrição nuclear

NFκB, estando altamente envolvido nas doenças alérgicas (CRIADO *et al.*, 2009). Os receptores H2 são principalmente expressos em músculos lisos vasculares, vias aéreas, endotélios, hepatócitos e principalmente em células parietais (RANG *et al.*, 2004). Os receptores H3 são predominantemente encontrados no cérebro, onde possuem função de receptores pré-sinápticos, modulando a liberação de diversos neurotransmissores, incluindo a própria histamina. Já os receptores H4 possuem alta expressão na medula óssea e são principalmente encontrados em células de origem hematopoiéticas periféricas, eosinófilos, neutrófilos, dendrócitos, linfócitos T, basófilos, mastócitos e, possuem baixa expressão em tecidos periféricos, hepatócitos, baço, timo, pulmões, intestino e coração (CRIADO *et al.*, 2010). Pouco se sabe sobre este receptor, apesar de estudos demonstrarem que os receptores H4 são expressos em células envolvidas nos processos inflamatórios, estimulando quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos. (THURMOND *et al.*, 2004).

A histamina possui ampla atuação em diversos processos pró-inflamatórios, tais como choque anafilático, prurido, eczema, rinite alérgica, asma, alergias alimentares, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, aumento da produção e secreção de muco pulmonar, além de induzir a adesão de eosinófilos. Por ser considerada potente mediador de diversos processos fisiológicos, muitos são os estudos em busca de drogas que pudessem coibir seus efeitos, os chamados anti-histaminicos, sendo os antagonistas dos receptores H1 a classe mais utilizada, ainda que seus efeitos indesejáveis sejam bem elucidados (IBIAPINA *et al.*, 2007).

Além da histamina, as tripases, também presentes nos grânulos, estimulam a quimiotaxia e acúmulo de eosinófilos e neutrófilos para o local da inflamação e promoverem a liberação de peroxidases e beta-hexosaminidases por eosinófilos. Além disso, estimulam células endoteliais de artérias coronarianas a liberarem ácido aracdônico, mediador primordial nas cascatas inflamatórias, e estimula a produção de fator de ativação de plaquetas (PAF) (MEYER *et al.*, 2005). As quimases, por sua vez, induzem a migração de eosinófilos e a secreção de mucina pelas células epiteliais brônquicas (HE *et al.*, 2004).

Outro mediador importante liberado pelos mastócitos é a heparina, que promove potente quimiotaxia de neutrófilos, aumentando assim a permeabilidade vascular através da formação de bradicinina (OSCHATZ *et al.*, 2011). Além disso,



desempenha papel essencial na promoção do armazenamento de outros compostos presentes nos grânulos dos mastócitos, regulando a atividade enzimática de determinadas proteases e, conseqüentemente, a liberação de alguns mediadores (RONNBERG *et al.*, 2012).

A liberação de TNF estimula a migração de mastócitos, promovendo a diferenciação celular, sobrevivência, e produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias (CROFT *et al.*, 2012).

Dentre os derivados do ácido aracdônico, podem ser citados o fator LTC<sub>4</sub>, que é produzido na membrana plasmática de mastócitos e basófilos. Quando liberados, promovem a migração de eosinófilos, aumento da permeabilidade vascular e broncoconstrição, acarretando em processo inflamatório (DEVI e DOBLI, 2012). As prostraglandinas D<sub>2</sub> por sua vez, são produzidas nos mastócitos principalmente nas doenças alérgicas. Induzem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias, e produção de citocinas (ARIMA e FUKUDA, 2008).

Além desses fatores, as citocinas liberadas pelos mastócitos também contribuem para a patogênese das doenças alérgicas, sendo um potente fator pró-inflamatório, estimulando maturação, ativação, migração e agregação de diversos tipos celulares envolvidos na inflamação, como mastócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos T citotóxicos (HE *et al.*, 2012). A IL-3 promove a maturação de mastócitos e basófilos, além de estimular a liberação de grandes quantidades de histamina, LTC<sub>4</sub>, IL - 4 e IL -13 a partir de basófilos. A citocina IL-4 induz a produção de grandes quantidades de anticorpo IgE pelos linfócitos B, além disso, é capaz de inibir o desenvolvimento de linfócitos T<sub>H1</sub>, bem como a IL-10, favorecendo desenvolvimento de resposta T<sub>H2</sub>. Outra função importante da citocina IL-4 é a indução da expressão de moléculas de adesão celular, migração transendotelial de eosinófilos e secreção de muco, desempenhando papel crucial na resposta inflamatória alérgica (TSCHOPP *et al.*, 2006).

As citocinas TNF- $\alpha$ , VEGF e TGF- $\beta$ , por sua vez, podem contribuir para a inflamação alérgica crônica com efeitos nos fibroblastos e células endoteliais vasculares (CHARLESWORTH, 1997).

### 1.3. A busca de Novas Substâncias para Tratamento de Alergias

As doenças alérgicas apresentam elevada prevalência na população brasileira, tendo a asma e a rinite alérgica os mais presentes entre os indivíduos. Representando, portanto, um problema global de saúde pública que atinge no mínimo 10 a 25% da população geral (CAMPANHA *et al.*, 2008).

Uma vez que a alergia é uma doença crônica, necessitando de tratamento constante, a busca por novos fármacos com atividade antialérgica torna-se interessante visto que, doenças alérgicas como a asma, por exemplo, causam um gasto elevado nos sistemas de saúde pública, além de prejudicar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (BAUDDH e SINGH, 2011).

Atualmente, as terapias utilizadas no tratamento das doenças alérgicas visam diminuir ou eliminar os sintomas gerados pelos mediadores inflamatórios liberados, sendo a histamina o principal deles. Assim, as principais intervenções farmacológicas incluem o uso dos anti-histamínicos, anti-inflamatórios, principalmente os glicocorticoides, e agonistas adrenérgicos (FERREIRA, 2011).

Apesar dos benefícios da terapia, diversos são os efeitos indesejáveis causados por esses medicamentos, especialmente quando utilizados em associação e por longos períodos, fato que limita sua utilização (BAUDDH e SINGH, 2011). O tratamento muitas vezes insatisfatório faz com que mais de 50% da população faça uso das denominadas terapias complementares (CAMPANHA *et al.*, 2008).

Considerando a importância do papel dos mediadores pró-inflamatórios, principalmente a histamina, em diversas doenças, e a limitação das terapias disponíveis, torna-se importante a busca de novos produtos que possam modular a resposta desses mediadores sobre os diferentes tecidos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Assim, uma das estratégias pensadas, é a busca por produtos que sejam capazes de inibir a secreção de histamina pelos mastócitos, o que produziria como ação imediata uma menor disponibilidade deste mediador e, conseqüentemente, reduzida ocupação de seus respectivos receptores, acarretando em diminuição direta de seus efeitos tanto nas reações de hipersensibilidade quanto nos processos inflamatórios (PARK *et al.*, 2008).

Os Produtos naturais surgem como uma alternativa aos medicamentos tradicionais, e tem ganhado espaço tanto em pesquisa como em desenvolvimento

de formulações devido à presença de diversas classes de metabólitos ativos produzidos pelas plantas com potencial atividade farmacológica, além da grande biodiversidade brasileira (de OLIVEIRA *et al.*, 2008). Essa grande disponibilidade de plantas com possíveis efeitos terapêuticos despertou o interesse mundial pela fitoterapia. Algumas classes de produtos naturais são inibidores potentes da desgranulação mastocitária. Entre essas classes podem ser citados os flavonóides que são compostos polifenólicos naturalmente presentes em vegetais, frutas, sementes e bebidas (JANEWAY e TAVARES, 2006).

A busca de novas substâncias com potencial terapêutico pode ser realizada por vários métodos, como modificação molecular de compostos ativos já existentes, síntese de novas moléculas e a bioprospecção a partir de produtos de origem naturais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Assim, diferentes modelos experimentais, sejam *in vivo* ou *in vitro*, são utilizados para avaliar a atividade ou potencial antialérgico de novas substâncias, incluindo os fitoterápicos.

Historicamente, a busca de novos ativos a partir de fontes naturais tem se mostrado promissora, visto que diversos fármacos de uso clínico como morfina, atropina, escopolamina (BIERLORY, 2004), os antineoplásicos vincristina e vimblastina, a emetina entre muitos outros e, mais recentemente substâncias novas e de grande importância como o antimalárico artemisinina e o antineoplásico taxol, dentre outros foram obtidos por esse método (CHIRIBOGA e DI STASI, 2006).

A seleção de espécies vegetais para a realização dos estudos a cerca de seus perfis farmacológicos, toxicológicos e fitoquímicos se dá, principalmente, através da abordagem etnofarmacológica, que considera o uso popular e tradicional de espécies vegetais como produto de valor medicinal, tendo papel importante na descoberta de novos fármacos (BIERLORY, 2004). Assim, a etnofarmacologia tem grande importância estratégica na seleção de espécies vegetais, principalmente no Brasil, onde a biodiversidade vegetal está atrelada ao amplo conhecimento popular e tradicional de suas propriedades, especialmente em interiores ou em tornos dos biomas brasileiros (DI STASI, 2005).

## 1.4. Espécies Vegetais Seleccionadas

### 1.4.1. *Passiflora mucronata*

A família Passifloraceae é composta por 17 gêneros e cerca de 630 espécies. A taxonomia é complexa e baseia-se em diversos caracteres florais e vegetativos, os quais produzem uma complexa subdivisão taxonômica em subgêneros, seções e séries (FARIAS, 2014).

O gênero *Passiflora* L. é o maior da família, sendo conhecidas aproximadamente, 520 espécies (WOHLMUTH *et al.*, 2010). Sua distribuição é predominante em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, cerca de 70 espécies são encontradas na região centro-oeste e faixas litorâneas, em áreas de restinga ao nível do mar (ZERAİK *et al.*, 2010).

Uma das principais características morfológicas do gênero é a presença de flores geralmente grandes, com mais de três centímetros de comprimento e muito coloridas em púrpura, branco, azuis, violetas, vermelho ou misturas dessas cores, o que explica seu elevado uso como planta ornamental (FARIAS, 2014).



Figura 1: *Passiflora mucronata* Lam. Fonte: [Http://Plantsystematics.org/imgs/shimizu/r/Passifloraceae-Passiflora-mucronata-45099.html](http://Plantsystematics.org/imgs/shimizu/r/Passifloraceae-Passiflora-mucronata-45099.html)

Além disso, o gênero *Passiflora* possui grande importância para indústria alimentícia devido a presença de seus frutos, o maracujá, podendo ser consumido na forma de sucos, doces, geleias, sorvetes, licores, entre outros. No país, o

maracujá amarelo (*P. edulis*, *P. flavicarpa*) é o mais cultivado e comercializado, devido à qualidade de seus frutos (ZERAİK *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica vem demonstrando grande interesse sobre o gênero *passiflora*, devido o potencial do maracujá como um alimento funcional, visto que diversos estudos indicaram a presença de substâncias polifenólicas (ZERAİK *et al.*, 2010), ácidos graxos poli-insaturados (KOBORI e JORGE, 2005), fibras (CÓRDOVA *et al.*, 2005), entre outras classes.

Uma das atividades biológicas mais estudadas com relação aos frutos do maracujá é sua ação antioxidante, sendo atribuída aos polifenóis encontrados em seu interior, principalmente os flavonoides (HEIM *et al.*, 2002).

Dentre as espécies mais conhecidas e estudadas, estão a *P. edulis*, muito utilizada na produção de sucos a partir de seus frutos, e a *P. alata* e *P. incarnata*, usadas na fabricação de medicamentos fitoterápicos a partir de suas folhas, sendo utilizados principalmente, para tratamentos de distúrbios do sono (ZERAİK *et al.*, 2010) e ansiolíticos (LI, 2011).

Sabe-se que os flavonoides são os principais constituintes do gênero *Passiflora*, principalmente os derivados de apigenina e luteolina (WOHLMUTH *et al.*, 2010). Embora haja diversos estudos a respeito das propriedades farmacológicas e alimentícias do gênero, a espécie *Passiflora mucronata* ainda é pouco estudada, não havendo referências na literatura a respeito de sua descrição química e de suas atividades biológicas, gerando assim, o interesse em estudá-la, visto que estudos preliminares a cerca de sua descrição fitoquímica demonstraram a presença de flavonoides e terpenos, que poderiam ser responsáveis por diversas atividades farmacológicas.

#### **1.4.2. *Vitex polygama***

Pertencente à família das verbanaceae, o gênero *Vitex* possui cerca de 250 espécies registradas, sendo encontradas ao longo de toda Ásia, Américas do Sul e Central, Caribe, África e Europa. No Brasil, ocorrem desde a Região Amazônica até o estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA, 2013).

Caracterizam-se como planta de grande porte, variando de tamanho entre arbustivo e arbóreo, podendo alcançar 20 m de altura e troncos de 15 cm de

diâmetro. Suas flores variam de azul ao violeta pálida ou rosada e frutos arroxeados e de paladar pouco agradável (Figura 2) (MOLDENKE, 1957).



Figura 2: *Vitex polygama*. Fonte: [Http:// terra-da-gente/platb/flora/taruma-do-cerrado-vitex-polygama/](http://terra-da-gente/platb/flora/taruma-do-cerrado-vitex-polygama/)

Popularmente o gênero é conhecido como azeitona do campo, Maria-preta, tarumã e outros, sendo as cascas dos galhos, folhas e frutos utilizados tradicionalmente como emenagogo, diurético e para tratamento de afecções renais (GALLO, 2004).

O perfil químico da família Verbanaceae é caracterizado por seus diversos metabólitos secundários, como: neolignanas, lignanas, naftoquinonas, iridóides carboxílicos, terpenóides, aromáticos, entre outros. O gênero *Vitex*, por sua vez, tem como principais substâncias já identificadas os ecdiosteróides, iridóides glicosilados, diterpenos, flavonoides C-glicosilados, triterpenos, lignanas, entre outras (JUDD *et al.*, 2001).

O perfil fitoquímico de *Vitex polygama* é bem elucidado, sendo descritas diversas as substâncias isoladas da espécie. O interesse pelo uso desta espécie no estudo sobre sua avaliação antialérgica se deve ao fato da grande presença de flavonóides encontrados em suas folhas, tais como: orientina e isoorientina (flavonas O-glicosídeos) e schaftosídeo e carlinosídeo (C-glicosilflavonas), sendo estes últimos possuidores de potente ação antiinflamatória, antinociceptiva e antioxidante (TAVARES *et al.*, 2011). Além disso, foi descrita a presença do flavonóide quercetina, que já possui ação comprovada sobre a inibição da desgranulação mastocitária (OLIVEIRA, 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

As doenças alérgicas apresentam elevada prevalência na população brasileira, tendo a asma e a rinite alérgica os mais presentes entre os indivíduos, sendo considerada a segunda maior complicação que afeta significativamente a qualidade de vida. Além disso, possuem grande importância sob o ponto de vista clínico, por se tratar de doença crônica que requer tratamento prolongado e muitas vezes em associação, restringindo a terapia e aumentando as chances de efeitos indesejáveis.

A busca e o desenvolvimento de novas substâncias com atividade terapêutica a partir de produtos naturais vêm se tornando cada vez mais promissor, devido à capacidade das plantas de produzirem uma ampla variedade de metabólitos secundários, com diferentes atividades biológicas.

No Brasil, estudos com plantas medicinais possuem um amplo espectro de possibilidades visto que o território nacional abriga aproximadamente 23% de toda a diversidade biológica do planeta. Porém, essa grande variedade vegetal ainda é pouco explorada, fato este que incentiva os estudos acerca de diferentes substâncias de origem natural com potencial atividade biológica, que podem ser candidatos a novas estratégias terapêuticas para o tratamento antialérgico.

Portanto, o presente trabalho propõe o estudo de duas espécies vegetais, presentes na Restinga de Jurubatiba (Macaé), avaliando a possível atividade antialérgica das espécies *Passiflora mucronata* e *Vitex polygama*, cujos relatos de atividades biológicas são ainda poucos na literatura científica.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivos Gerais

O presente estudo tem como objetivo estudar os extratos das plantas medicinais *Passiflora mucronata* e *Vitex polygama*, presentes na região Norte Fluminense (restinga de Jurubatiba), de forma a investigar seus efeitos sobre a atividade antialérgica e terapêutica, através da avaliação da inibição da desgranulação de mastócitos e inibição da liberação de histamina *in vitro*.

### 3.2. Objetivos Específicos

- I. Testar a citotoxicidade dos extratos brutos de *P. mucronata* e *V. polygama* em macrófagos *in vitro*.
- II. Avaliar a atividade inibitória de *P. mucronata* e *V. polygama* sobre a desgranulação de mastócitos *ex vivo*;
- III. Avaliar a atividade inibitória de *P. mucronata* e *V. polygama* sobre a liberação de histamina pelos mastócitos *in vitro*;
- IV. Estudar a atividade de diferentes frações químicas de *P. mucronata* e *V. polygama* sobre a liberação de histamina pelos mastócitos *in vitro*;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais utilizados

#### 4.1.1. Animais

Ratos Wistar fêmeas foram cedidos pelo biotério da UFRJ Campus Macaé. Os animais foram mantidos com ração peletizada, água filtrada e maravalha esterilizada, e utilizados com aproximadamente 10 meses de vida, de acordo com as Normas da Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa do Campus UFRJ Macaé (protocolo MACAE06).

#### 4.1.2. Coleta das Espécies Vegetais

As espécies vegetais utilizadas para o estudo foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, entre os municípios de Quissamã, Carapebus e Macaé (22° e 22°23'S e 41°15' e 41°45'W) em março de 2012. A identificação botânica foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Gilberto Dolejal Zanetti e as exsiccatas foram depositadas no banco de produtos naturais do Laboratório de Produtos Naturais (LaProN) da UFRJ, Campus Macaé. Os números das exsiccatas, as partes



utilizadas, tipo de extrato obtido e o seu respectivo código estão descritos no Quadro 3.

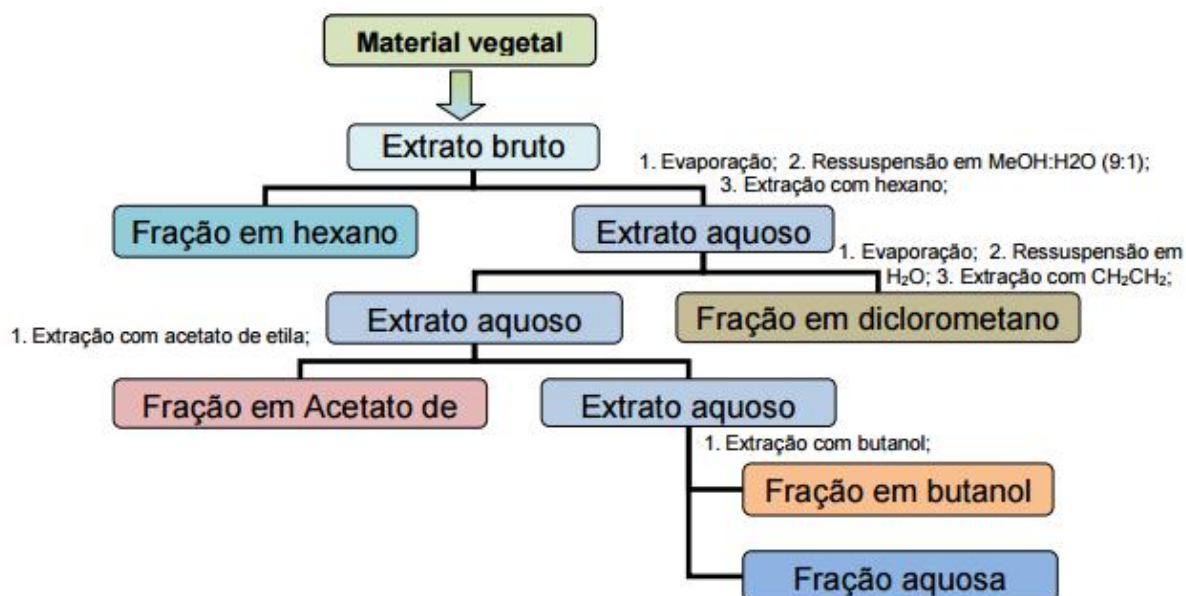
**Quadro 3:** Espécies vegetais selecionadas. Código botânico (exsicata); partes utilizadas; tipo de extrato e códigos estabelecidos.

<b>Espécies vegetais</b>	<b>Exsicata</b>	<b>Partes utilizadas</b>	<b>Tipo de extrato</b>	<b>Código das amostras</b>
<i>Passiflora mucronata</i> Extrato hidroalcoólico	RFA38758	Folhas	Extrato Bruto Fração Acetato de Etila	Pm EB Pm AcOEt
<i>Vitex polygama</i> Extrato hidroalcoólico	RFA38750	Folhas	Extrato Bruto Fração Acetato de Etila Fração Butanólica	Vp EB Vp AcOEt Vp BuOH

#### **4.1.3. Preparo dos Extratos Brutos e Frações de *Passiflora mucronata* e *Vitex polygama***

As partes coletadas das espécies vegetais foram secas à temperatura ambiente, pesadas, trituradas e submetidas à extração por maceração estática com etanol:água (7:3), havendo renovação do solvente extrator até o esgotamento total do material vegetal. Os extratos em etanol foram filtrados em papel de filtro e rotaevaporados resultando nos extratos brutos. Os extratos brutos foram ressuspensos em uma solução metanol:água (9:1) e, submetidos à partição líquido/líquido com solventes orgânicos de diferentes polaridades iniciando com n-hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, sendo também obtido o resíduo aquoso. As frações com solventes orgânicos foram concentradas em rotaevaporador até a total remoção do solvente. Foram adotados os solventes em ordem crescente de polaridade, como pode ser observado no esquema abaixo (Figura 3). O resíduo aquoso após rotaevaporação foi liofilizado. Os extratos brutos das folhas de cada uma das espécies vegetais, bem como as frações em Acetato de Etila de *Passiflora mucronata* e frações em Acetato de Etila e Butanol de *Vitex polygama* foram cedidos

pelo Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (LaPron), Campus Macaé -UFRJ, tendo sido preparados com a colaboração das Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ivana Correa Ramos Leal, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Denise de Oliveira Guimarães.



**Figura 3:** Esquema da partição líquido/líquido para obtenção das diferentes frações.

Antes da sua utilização, os extratos foram solubilizados na concentração de estoque de 1 mg/mL, utilizando como solvente solução tampão fostafo-salino (PBS) e estocados a -20°C até o momento de uso.

## 4.2. Metodologia realizada

### 4.2.1. Ensaio de Citotoxicidade em Macrófagos

#### 4.2.1.1. Isolamento e cultura de macrófagos peritoneais de rato

Foram injetados 20 mL de meio DMEM (Dulbecco's modified Eafle's médium) na cavidade peritoneal de ratos Wistar eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>.

O líquido da cavidade peritoneal foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 10<sup>5</sup> C e 1100 rpm. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi ressuspensão em meio DMEM.

A viabilidade celular foi avaliada com corante Azul de Trypan. A suspensão de células foi ajustada na concentração de  $7,5 \times 10^6$  cel/mL.

Fez-se a adição de 200  $\mu$ L da suspensão de células por poço em placa estéril de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C/5% CO<sub>2</sub> por 1 hora para adesão dos macrófagos.

#### 4.2.1.2. Preparo do Ensaio de Citotoxicidez

Em seguida, as amostras foram adicionadas nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL, exceto os grupos controle não tratados (Meio DMEM apenas) ou tratados com Triton X-100 a 10%, incubando-se a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Passado o tempo, coletou-se o sobrenadante das células para posterior dosagem de LDH.

#### 4.2.1.3. Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada medindo-se a liberação da enzima LDH utilizando-se um kit colorimétrico (Doles) adaptado para a dosagem em sobrenadante de células. Resumidamente, fez-se adição de 100  $\mu$ L do reagente Alúmen Férrico + Substrato a cada 50  $\mu$ L de amostra, e incubou-se por 2 minutos a 37°C.

Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu$ L da mistura reagente FMS + NAD em cada poço, incubando-se a 37°C por 5 minutos.

A concentração de LDH, que representa uma indicação indireta de citotoxicidez, foi determinada colorimetricamente em leitor de ELISA a 492nm.

O percentual relativo de liberação de LDH foi calculada através da equação 1, abaixo

$$\text{Percentual Relativo da Liberação de LDH} = \frac{(\text{D.O}_{\text{amostra}} - \text{D.O}_{\text{controle negativo}}) * 100}{(\text{D.O}_{\text{Triton}} - \text{D.O}_{\text{controle negativo}})}$$

**Equação 1:** Calculo do percentual de citotoxicidade a partir dos valores de densidade óptica obtidos (D.O).

#### **4.2.2. Ensaio da Desgranulação de Mastócitos**

Para o ensaio da desgranulação de mastócitos, as membranas de mesentérios de ratos Wistar fêmeas foram isoladas e incubadas *ex-vivo*, sendo subdivididas em 6 grupos experimentais: grupo Controle Negativo (não sensibilizado e não tratado); grupo Controle Positivo (sensibilizado e desafiado, sem receber tratamento), considerado o “máximo de desgranulação”; grupo Padrão Quercetina, flavonoide com ação sobre a inibição da desgranulação mastocitária já descrita na literatura e, os grupos que foram tratados com os extratos analisados e, os grupos que receberam o tratamento com os extratos em diferentes concentrações.

Primeiramente, as membranas contendo os mastócitos foram sensibilizadas com 500µL de anticorpo IgEαDNP a uma concentração de 0,001 mg/mL, com exceção do grupo controle negativo que recebeu apenas PBS (solução salina), e incubadas por 1 hora a 36°C.

Em seguida, foi realizado o tratamento com os extratos etanólicos brutos de folhas das espécies vegetais *Passiflora mucronata* e *Vitex polygamas* nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, obtidas por diluição seriada, partindo-se de uma concentração estoque de 1 mg/mL.

O flavonoide quercetina foi utilizado a 0,1 mg/ml. As membranas foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos.

Posteriormente, todos os grupos foram desafiados com antígeno DNP a 0,0001 mg/mL, sendo levados à incubação por 1 hora a 37°C.

Por fim, as membranas foram coradas com corante Azul de Toluidina e os mastócitos desgranulados e intactos foram contabilizados em microscópio óptico invertido no aumento de 40x.

#### **4.2.3. Ensaio da Liberação de Histamina**

##### **4.2.3.1 Isolamento de Mastócitos Peritoniais de Rato**

Após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> foram injetados 20 mL de PBS/BSA 0,1% gelado na cavidade peritoneal de ratos Wistar e o lavado peritoneal foi recolhido e

centrifugado a 150 g por 5 minutos a 25°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi ressuspenso em 1 mL de PBS/BSA 0,1%.

O volume celular obtido foi adicionado lentamente a 4 mL do reagente Percoll a 72% e, centrifugado a 150g por 30 minutos à 25°C, de forma a isolar os mastócitos dos outros tipos celulares por gradiente de densidade.

O anel de mastócitos obtido foi coletado e ressuspenso em 1 mL de meio Hanks rico em cálcio e magnésio.

A contagem dos mastócitos foi realizada com o corante Azul de Toluidina e a concentração ajustada para  $3 \times 10^5$  mastócitos/mL, adicionando-se 400  $\mu$ L da suspensão de células por poço em placa estéril de 24 poços.

#### **4.2.3.2 Tratamento dos Mastócitos com os Extratos Vegetais Brutos e suas Frações**

Primeiramente, os mastócitos foram tratados com o anticorpo IgE $\alpha$ -DNP (0,5  $\mu$ g/mL), com exceção dos grupos controle negativo de desgranulação, grupo tratado com Composto 48/80 e grupo ácido perclórico, sendo incubados a 37°C / CO<sub>2</sub> 5% durante 12 horas.

Realizou-se o tratamento com os extratos brutos das espécies vegetais *P. mucronata* e *V. polygama* a 0,5 mg/ mL, e com suas frações ou com o flavonóide Quercetina a 0,1 mg/mL. Os grupos controle negativo, Composto 48/80 e ácido perclórico, receberam apenas o meio Hanks, nesta etapa. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) durante 1 hora a 37°C.

Após, as células foram desafiadas com antígeno DNP (0,05  $\mu$ g/mL), com exceção dos grupos composto 48/80, que receberam 100  $\mu$ L desse composto e, o grupo ácido perclórico (0,4N). A placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%).

Passado o tempo, a placa foi centrifugada a 150 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante obtido coletado para posterior quantificação de histamina pela técnica de ELISA competitivo. O experimento foi realizado em duplicata, sendo representativo de 3 ensaios.

#### 4.2.3.3. Dosagem de Histamina por ELISA competitivo

Inicialmente, foram preparadas diluições do padrão de histamina nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0 ng/ml. Sendo adicionadas, em duplicata, em placa de 96 poços. Na mesma placa, foram adicionados também 50 µL por poço do sobrenadante das amostras a serem analisadas.

Em seguida, fez-se a adição de 50 µL de anticorpo de detecção (50µL/ poço) em todos os poços, incubando-se por 45 min em estufa a 37°C.

Passado o tempo, o conteúdo foi dispensado e os poços foram lavados 3x com solução de lavagem.

Após, adicionou-se 100 µL de conjugado HRP nos poços e incubou-se por 30 minutos em estufa a 37°C.

Repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se 90 µL de substrato em cada poço, ao abrigo de luz, e incubou-se por 15 minutos em estufa a 37°C.

Por fim, fez-se adição de 50 µL de solução de parada e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 490 nm.

#### 4.3. Análise Estatística

Para comparação dos resultados obtidos, estes foram relatados em valores de média  $\pm$  desvio padrão, sendo avaliados através de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o software BioEstat<sup>®</sup> versão 5.0. Foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,01$ .

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos em Macrófagos *in vitro*

Um importante critério na pesquisa de produtos naturais com potencial atividade biológica é determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células. Os ensaios de avaliação da citotoxicidade definem o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelos extratos ou seus constituintes. Assim, a citotoxicidade dos

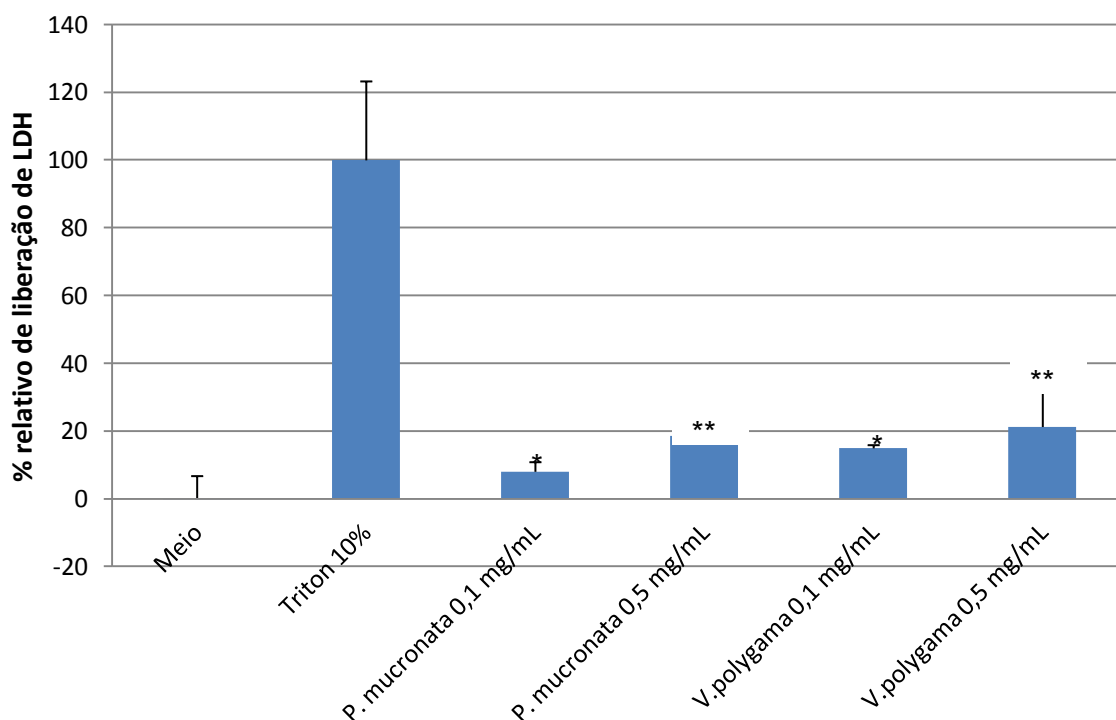
extratos foi avaliada através da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) por macrófagos. Uma vez que esta é uma enzima citosólica, sua presença em um fluido ou meio extracelular é um indicativo de que houve morte celular seguida de rompimento de sua membrana. (LANTTO *et al.*, 2009).

Neste ensaio, os macrófagos peritoniais receberam o tratamento com os extratos em diferentes concentrações (0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL). Como controle positivo para a técnica foi utilizado o composto triton X-100, que é um detergente surfactante capaz de romper a membrana das células (lise celular) e liberar o material intracelular na forma solúvel (OLIVEIRA, 2013), sendo, portanto utilizado como o máximo de liberação de LDH. Já o controle negativo, não recebeu nenhum tratamento, indicando lise mínima das células.

Conforme demonstrado na figura 4, os extratos brutos de *P. mucronata* nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL apresentaram percentual relativo de liberação de LDH de  $8\% \pm 2,8$  e  $18,4\% \pm 3,4$  respectivamente, sendo significativamente inferiores ao grupo controle positivo (Triton 10%), com  $99,9\% \pm 23\%$  de liberação relativa de LDH.

Para os extratos brutos de *V. polygama*, as duas concentrações testadas também apresentaram valores de percentual de liberação relativa de LDH inferiores quando comparados ao grupo controle positivo, sendo de  $14,92 \pm 0,2$  para a concentração de 0,1 mg/mL e  $21,22\% \pm 19$  para a concentração de 0,5 mg/mL.

Sendo assim, pode-se considerar que os extratos de *P. mucronata* e *V. polygama*, em ambas as concentrações testadas, não apresentaram citotoxicidade, permitindo sua aplicação experimental com segurança.



**Figura 4:** Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *P. mucronata* e *V. polygama* sobre macrófagos, mensurada através da porcentagem de liberação específica de lactato desidrogenase (LDH). Macrófagos de ratos foram isolados da cavidade peritoneal e tratados com os extratos de *P. mucronata* e *V. polygama*, nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL a 37°C/5% por 30'. Em placa de ELISA, os sobrenadantes receberam reagente Alúmen Férrico+substrato por 2' a 37°C/5% e FMS+NAD por 5'. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 490nm. Média  $\pm$  desvio padrão (n=6). \* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle positivo. Este resultado é representativo de 2 experimentos.

## 5.2. Atividade Inibitória dos Extratos Brutos de *P. mucronata* e *V. polygama* Sobre a Desgranulação de Mastócitos

Uma vez que a desgranulação de mastócitos é um evento primordial na resposta alérgica inflamatória, avaliou-se se os extratos brutos de *P. mucronata* e *V. polygama* seriam capazes de inibir a desgranulação dessas células e, se a inibição seria de forma concentração-dependente ou não. Para isso, seguiu-se o modelo *ex vivo* de desgranulação de mastócitos utilizando membranas mesentéricas de ratos, devido a grande concentração dessas células presente nesse tecido.

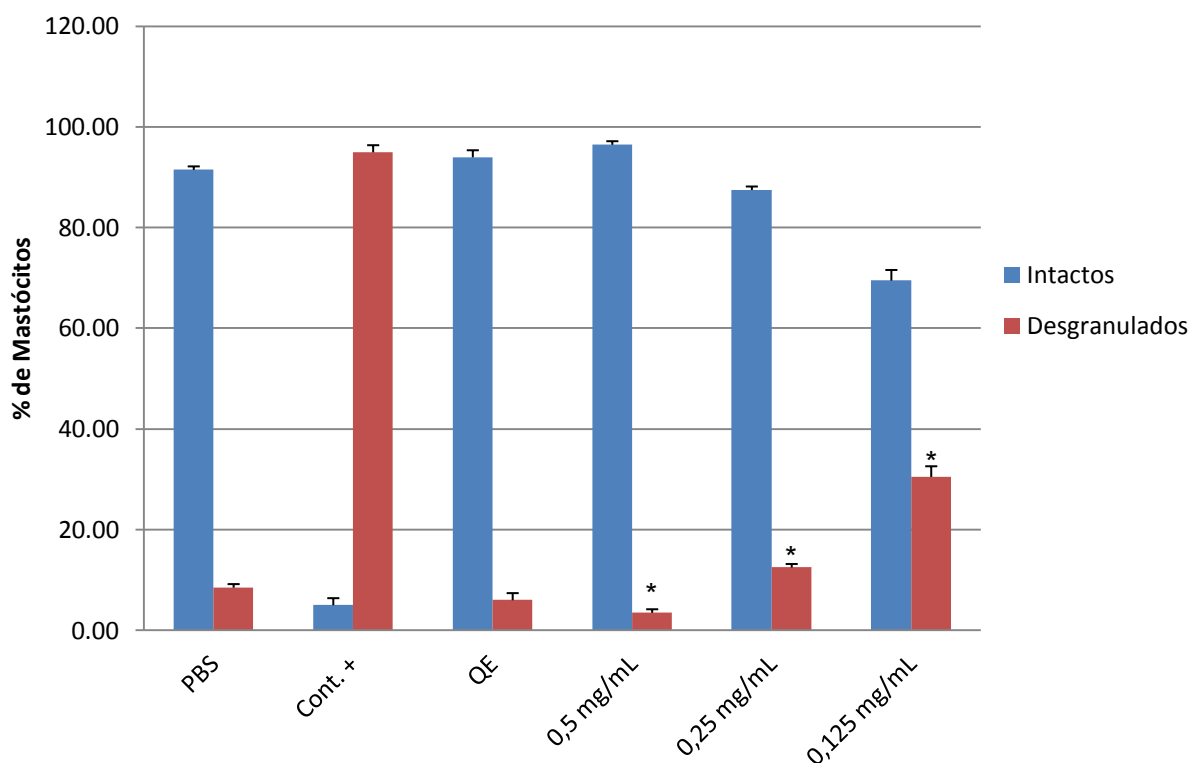


Para o grupo controle de substância natural com efeito sobre a desgranulação mastocitária, utilizou-se o flavonoide Quercetina, extraído de espécies vegetais, cuja ação inibitória da desgranulação de mastócitos já é cientificamente comprovada (TAKEMURA *et al.*, 1997).

O grupo controle positivo foi sensibilizado e desafiado com antígeno IgE $\alpha$ DNP, não recebendo tratamento. Indicando assim o máximo de desgranulação mastocitária.

O grupo PBS, por sua vez, não foi sensibilizado com anticorpo IgE e não recebeu tratamento, apenas foi desafiado com antígeno DNP, indicando assim a desgranulação basal, sendo importante para o monitoramento da técnica, aferindo que o efeito da ativação dos mastócitos nesta técnica é por via imunológica, dependente de anticorpo IgE.

Para o extrato bruto de *Passiflora mucronata*, foi observado uma diminuição significativa no percentual de mastócitos desgranulados quando comparado ao grupo controle não tratado ( $95 \pm 1,41\%$ ). Como demonstra a Figura 5, a concentração de 0,5 mg/mL do extrato de *P. mucronata* apresentou maior efeito sobre a inibição da desgranulação, apresentando  $3,5 \pm 0,71\%$  de mastócitos desgranulados, quando comparada às concentrações de 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, que apresentaram  $12,5 \pm 0,71\%$  e  $30,5 \pm 2,21\%$ , respectivamente. Embora todas as concentrações testadas tenham causado uma inibição estatisticamente significativa sobre a desgranulação mastocitária, pode-se observar que quanto mais diluído o extrato, menor sua atividade, sendo assim, um efeito concentração-dependente.



**Figura 5:** Avaliação da atividade do extrato bruto de *P. mucronata* sobre a inibição da desgranulação de mastócitos. Mastócitos do mesentério de ratos Wistar fêmeas foram sensibilizados com IgE a-DNP 0,001 mg/mL por 1" a 36°C. As células foram tratadas com extrato bruto de *P. mucronata*, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL (exceto os grupos: PBS, Controle positivo e Quercetina) por 30' a 36°C. Em seguida, as células foram ativadas com DNP 0,0001 mg/mL por 30' a 36°C. O percentual de células desgranuladas ou intactas foi analisado em microscópio óptico invertido após coloração com Azul de Toluidina. Média  $\pm$  S.D (n=6).  $p < 0,01^*$  comparado ao grupo controle positivo. Este resultado é representativo de 3 experimentos.

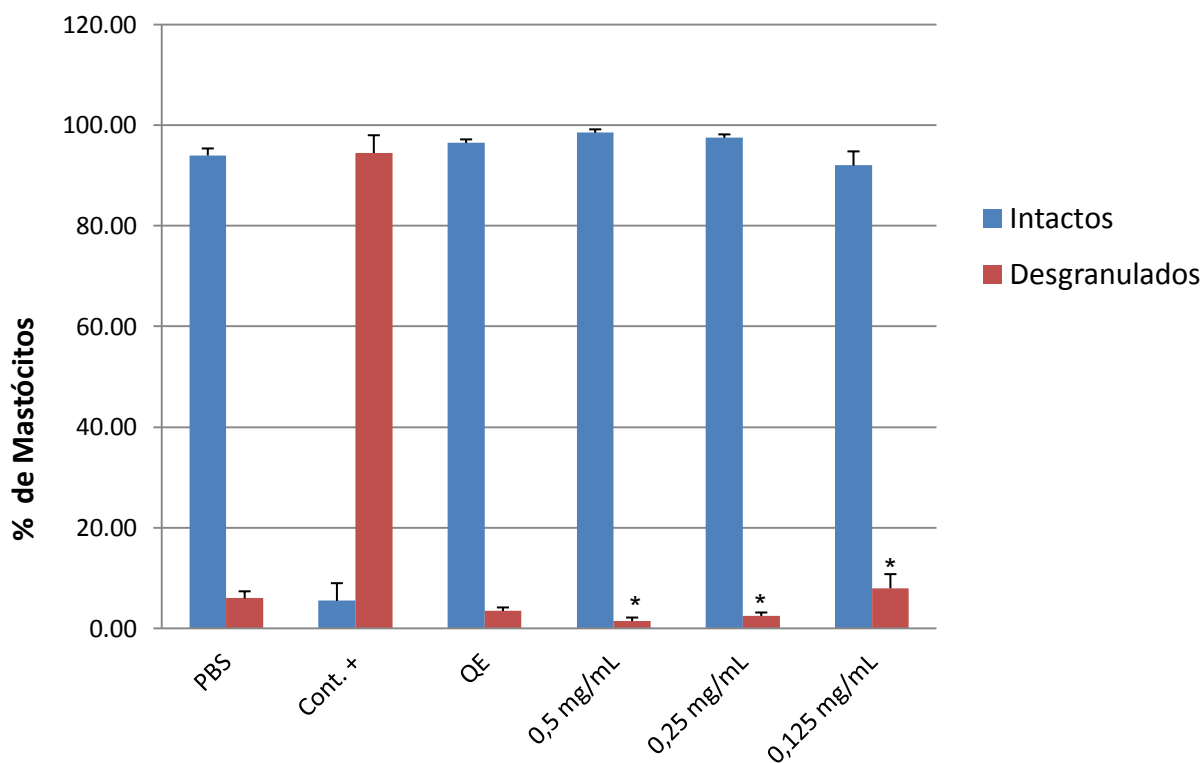
Sabe-se que os compostos polifenólicos, tais como flavonóides, são conhecidos por possuírem ampla atividade biológica, incluindo a atividade antialérgica (OLIVEIRA, 2013). Dentre a classe dos flavonoides, a quercetina, isolada das folhas de diversas espécies vegetais, é conhecida por sua ação inibitória sobre a desgranulação dos mastócitos (CHIRUMBOLO, 2010).

O gênero *Passiflora* possui como principais constituintes químicos os flavonóides, principalmente os derivados de apigenina e luteolina (Wohlmut, 2010).

Estudos em andamentos com a espécie *P. mucronata*, no Laboratório de Síntese e Purificação de Produtos Naturais e Bioativos, Campus Macaé-UFRJ, demonstraram a presença de dois tipos distintos de flavonoides no extrato bruto

dessa planta, sugerindo assim que a capacidade do extrato de causar a inibição da desgranulação esteja relacionada à presença dessas substâncias.

Ao se avaliar o tratamento com o extrato bruto de *V. polygama*, foi observado que este também apresentou uma redução significativa no percentual de mastócitos desgranulados quando comparado ao grupo controle não tratado ( $94,5 \pm 3,5\%$  de células desgranuladas). Como demonstrado na Figura 6, a concentração de 0,5 mg/mL apresentou leve aumento na inibição da desgranulação dos mastócito ( $1,5 \pm 0,71\%$ ) quando comparada às concentrações de 0,25 mg/mL ( $2,5 \pm 0,71\%$ ) e 0,125 mg/mL ( $8 \pm 2,83\%$ ). Porém, essa diferença nos valores percentuais da inibição não foi considerada significativamente estatística. Assim, a inibição da desgranulação de mastócitos pelo extrato de *V. polygama* não ocorre de maneira concentração-dependente. Esta inibição da desgranulação por mastócitos pode estar relacionada à presença de diversos tipos de flavonoides já isolados da planta, tais como: orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina luteonina, entre outros e, em especial, o flavonoide quercetina, que também pode ser extraído a partir de folhas de *V. polygama*. e possui ação significativa na inibição da desgranulação (TAVARES et al, 2011).



**Figura 6:** Avaliação da atividade do extrato bruto de *V. polygama* sobre a inibição da desgranulação de mastócitos. Mastócitos do mesentério de ratos Wistar fêmeas foram sensibilizados com IgE a-DNP 0,001 mg/mL por 1" a 36°C. As células foram tratadas com extrato bruto de *V. polygama*, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL (exceto os grupos: PBS, Controle positivo e Quercetina) por 30' a 36°C. Em seguida, as células foram ativadas com DNP 0,0001 mg/mL por 30' a 36°C. O percentual de células desgranuladas ou intactas foi analisado em microscópio óptico invertido após coloração com Azul de Toluidina. Média  $\pm$  S.D (n=6).  $p < 0,01^*$  comparado ao grupo controle positivo. Este resultado é representativo de 3 experimentos.

### 5.3. Avaliação da Atividade dos Extratos e sua Frações sobre a Inibição da Liberação de Histamina

A histamina é um importante mediador da resposta alérgica, sendo liberada imediatamente após a desgranulação dos mastócitos.

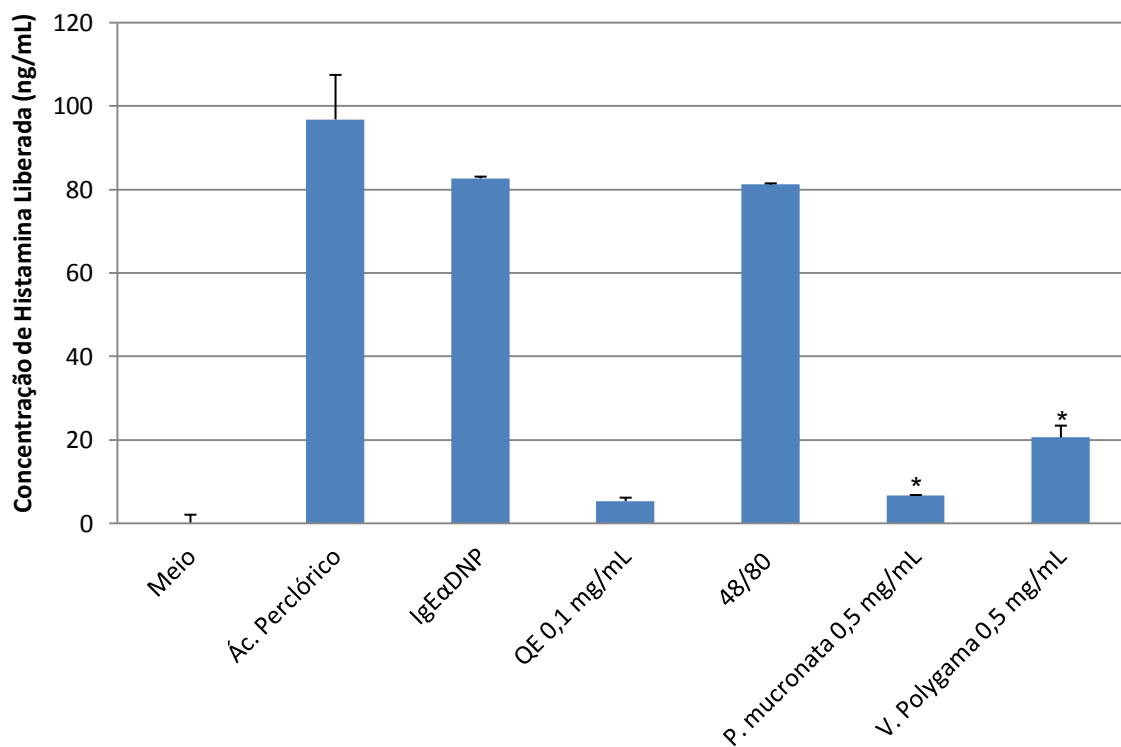
Como controle positivo da liberação de histamina, utilizou-se o grupo IgE $\alpha$ DNP, onde as células não receberam tratamento, sendo apenas sensibilizadas com anticorpo e desafiadas com antígeno, representando o máximo de liberação de histamina pelos mastócitos através de sua ativação por via imunológica.

Os grupos controle composto 48/80 e ácido perclórico representam o máximo de liberação de histamina através da ativação de mastócitos por via não imunológica, sendo independente de anticorpo IgE (FERRY *et al.*, 2002).

Após o tratamento dos mastócitos com os extratos vegetais e sua posterior estimulação, observou-se que o grupo controle positivo (IgE $\alpha$ DNP) apresentou liberação de histamina igual a  $82,68 \pm 0,4$  ng/mL e, os grupos controle composto 48/80 e ácido perclórico apresentaram  $81,21 \pm 0,2$  ng/mL e  $96,80 \pm 10$  ng/mL, respectivamente.

Os mastócitos tratados com o extrato de *P. mucronata* apresentaram  $6,66 \pm 0,1$  ng/mL de histamina liberada, enquanto o grupo tratado com extrato de *V. polygama* apresentou liberação de histamina de  $12,6 \pm 2,8$  ng/mL (Figura 7).

Desta forma, pode-se considerar que as espécies vegetais foram capazes de inibir a liberação de histamina de forma significativa (\* $p < 0,01$ ) quando comparadas ao grupo controle sensibilizado com IgE.



**Figura 7:** Avaliação da atividade dos extratos vegetais de *P. mucronata* e *V. polygama* sobre a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos. Mastócitos de peritônio de ratos normais foram isolados e incubados com IgE anti-DNP por 12 horas. Após, as células foram tratadas com os extratos vegetais a 0,5mg/ml, Quercetina a 0,1 mg/ml ou 48/80 a 0,5mg/mL. O grupo controle positivo (IgEαDNP) foi apenas sensibilizado e desafiado com antígeno DNP, não recebendo tratamento, enquanto o grupo Ácido Perclórico não foi sensibilizado nem desafiado, recebendo o tratamento apenas com o ácido. A quantidade de histamina liberada foi medida no sobrenadante das células por imunoensaio competitivo. Média ± S.D. (n=2). \*p< 0,01 em relação aos grupos controle positivo (IgEαDNP) e 48/80. Este resultado é representativo de 3 experimentos.

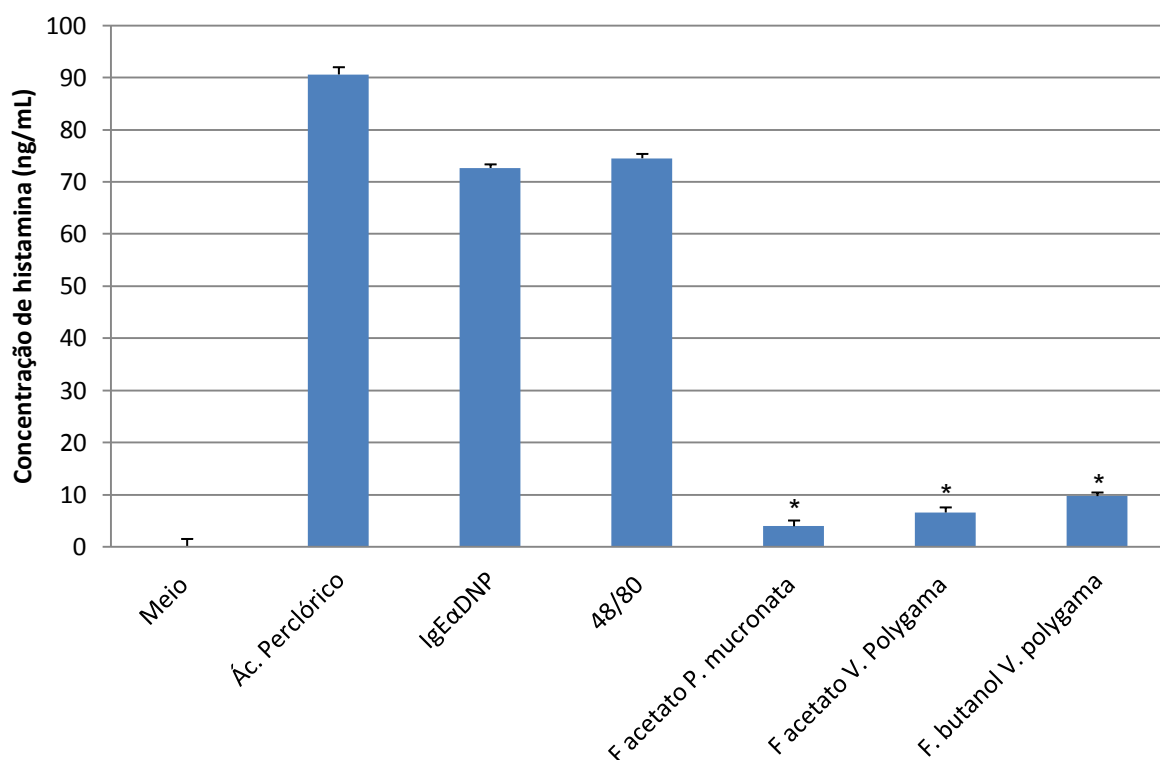
Uma vez que os extratos brutos apresentaram atividade inibitória sobre a liberação de histamina *in vitro*, deu-se sequência aos estudos dessas espécies vegetais avaliando-se a atividade de suas frações químicas.

Assim, foram selecionadas para teste as frações em Acetato de Etila de *P. mucronata* e frações em Acetato de Etila e Butanol de *V. polygama*, uma vez que a polaridade desses solventes permite a extração de diversos tipos de flavonoides,

sendo interessante para o ensaio em questão devido à capacidade dessas substâncias de atuarem na inibição da desgranulação mastocitária e, conseqüentemente, na inibição da liberação de seus mediadores (OLIVEIRA, 2013).

De acordo com os dados demonstrados na Figura 8, o grupo controle positivo (IgE $\alpha$ DNP) apresentou liberação de histamina igual a 72,68%  $\pm$  0,6 ng/mL, enquanto o grupo composto 48/80 apresentou liberação de histamina de 74,54  $\pm$  0,8 ng/mL. Para a fração acetato de etila de *P. mucronata*, a liberação de histamina foi de 3,96  $\pm$  1,1 ng/mL. E, com relação às frações acetato de etila e butanólica de *V. polygama*, foi obtido 6,6  $\pm$  0,9 ng/mL e 9,7  $\pm$  0,6 ng/mL de liberação de histamina, respectivamente.

Estes dados indicaram que as diferentes frações dessas espécies vegetais foram capazes de inibir de forma significativa (\*p<0,01) a liberação de histamina quando comparadas aos grupos controle positivo (IgE $\alpha$ DNP).



**Figura 8:** Avaliação da atividade das frações acetato de etila de *P. mucronata* e acetato de etila e butanólica *V. polygama* sobre a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos. Mastócitos de peritônio de ratos normais foram isolados e incubados com IgE anti-DNP por 12 horas. Após, as células foram tratadas com as frações dos extratos vegetais a 0,5mg/ml ou 48/80 a 0,5mg/mL. O grupo controle positivo (IgEαDNP) foi apenas sensibilizado e desafiado com antígeno DNP, não recebendo tratamento. A quantidade de histamina liberada foi medida no sobrenadante das células por imunoenensaio competitivo. Média ± S.D. (n=2). \*p< 0,01 em relação aos grupos controle positivo (IgEαDNP) e 48/80. Este resultado é representativo de 3 experimentos.

Embora o modelo *in vitro* de avaliação da liberação de histamina não considere os aspectos farmacocinéticos, eles são fundamentais na pesquisa de novos ativos de origem natural, uma vez que permitem a utilização de um pequeno número de animais e reduzida quantidade de material vegetal, sendo uma estratégia importante para o fracionamento biomonitorado de um determinado extrato, facilitando a seleção de frações e/ou subfrações mais ativas, as quais posteriormente podem ser estudadas em modelos *in vivo* (ALVES *et al.*, 2010).

Estudos em andamento realizados com a espécie *P. mucronata* no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, Campus Macaé-UFRJ, demonstraram que os flavonoides são os componentes majoritários do extrato bruto, confirmando o



que diz a literatura sobre a composição química do gênero *Passiflora*. Além disso, foi constatado, através do fracionamento bioguiado, utilizando solventes de diferentes polaridades, que os flavonoides são melhor extraídos e isolados em frações de acetato de etila, sendo os componentes principais dessa fração.

Para a espécie vegetal *V. polygama*, diversos estudos já demonstraram a presença de grande variedade de metabólitos secundários em seu extrato bruto, em especial os flavonoides, principalmente Vitexina (TAVARES et.al, 1999). Estudos de RMN da fração em acetato de etila dessa espécie propuseram a presença do flavonoide quercetina, além de mistura de flavonoides glicosilados e moléculas similares aos triterpenos. Enquanto a fração butanólica apresentou a presença principalmente de taninos (GALLO, 2004).

Outros estudos com diferentes espécies vegetais confirmam que compostos fenólicos, em especial os flavonoides, são os componentes majoritários nas frações em acetato de etila, e que estes podem estar diretamente relacionados ao efeito inibidor da secreção de histamina, assim como também foi relatada a atividade anti-inflamatória de diversos extratos que possuíam flavonoides como componentes majoritários (DE OLIVEIRA, 2013)

De modo geral, os extratos brutos analisados de *P. mucronata* e *V. polygama*, bem como suas respectivas frações em acetato, apresentam flavonoides em sua composição (GALLO, 2004), o que poderia explicar os efeitos positivos sobre a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos. Isto porque essas substâncias podem promover seus efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos por diversos mecanismos (HOSSAIN et al., 2013). Um deles seria através da inibição da liberação e síntese de substâncias endógenas que promovem a inflamação, como a histamina (CHI et al., 2011 e CHIRIMBOLO et al., 2010).

A correlação entre a presença de flavonoides em diversas plantas medicinais e suas atuações como agentes inibidores da secreção de mastócitos vem sendo cada vez mais apontada (PARK et al., 2008). Dentre eles, a quercetina, flavonoide isolado de *Quercus sp* e presente em diversas espécies vegetais, como *V. polygama*, possui atividade antialérgica e anti-inflamatória bem descritas, atuando por diferentes mecanismos de ação, como diminuição da secreção de mastócitos através da diminuição dos níveis citosólicos de cálcio (WENG et al., 2013) e por

diminuição da atividade de proteína cinase, além de interferir na liberação dos grânulos mastocitários mediada por IgE (CHIRUMBOLO *et al.*, 2010).

Outro mecanismo atribuído aos flavonoides é seu efeito estabilizador de membrana de mastócitos e basófilos, prevenindo a exocitose dos grânulos e, conseqüentemente, liberação de histamina (PEARCE, 1984).

Chirumbolo, em estudos com diversas espécies vegetais, sugeriu que um dos mecanismos de atuação dos flavonoides na inibição da secreção de mediadores pro-inflamatórios por via não-imunológica seria por interferir em algum ponto da via de sinalização do composto 48/80, como a ativação da proteína cinase C, responsáveis pelo aumento das concentrações de cálcio intracelular, impedindo assim o processo de exocitose dos mastócitos com a liberação de histamina (CHIRUMBOLO *et al.*, 2010).

Assim, os estudos a cerca dessa classe de substâncias demonstram que estes são um amplo grupo de compostos com diversos mecanismos de ação relacionados às suas atividades antialérgicas e anti-inflamatórias (TAUR e PATIL, 2011), permitindo-se relacionar a presença dos flavonoides nos extratos brutos e frações acetato de *P. mucronata* e *V. polygama* com seus efeitos sobre a inibição da liberação de histamina observados no presente trabalho. Para isso, tornam-se necessários estudos posteriores com substâncias isoladas dos extratos vegetais aqui testados.

Adicionalmente aos flavonoides, outros compostos fenólicos, como os taninos, foram descritos na fração butanólica de *V. polygama* (GALLO, 2004). Estes compostos possuem atividade inibitória sobre a liberação de histamina por inibirem o aumento de cálcio intracelular no mastócito. Podendo ser considerada a possibilidade de envolvimento desses compostos reconhecidamente relacionadas a atividade antialérgica e inibidores da secreção de mastocitos, como alguns tipos de cumarinas e compostos triterpenoides (DE SOUZA SANTOS, 2013).

Em outro estudo, realizado com diferentes espécies vegetais, foi demonstrado que os extratos que possuíam taninos como componentes majoritários, foram capazes de inibir a liberação induzida de histamina (DE OLIVEIRA, 2011). Estes dados permitiram relacionar o efeito positivo da fração butanólica de *V. polygama* sobre a liberação de histamina com a presença dos taninos na fração.

Desta maneira, os resultados demonstraram a importância do fracionamento biomonitorado, uma vez que estes podem apresentar diferentes classes de substâncias, além de permitir a identificação de frações mais ativas, bem como a identificação dos principais constituintes químicos ativos como inibidores da liberação de histamina.

A atividade biológica observada para os extratos brutos e frações das espécies vegetais aqui selecionadas está provavelmente relacionada à presença de diferentes compostos, especialmente os flavonoides e taninos.

## 6. CONCLUSÃO

- a. A análise de citotoxicidade dos extratos brutos das espécies vegetais estudadas não demonstraram efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos.
- b. Os resultados obtidos permitem prever que tanto o extrato bruto de *Passiflora mucronata* como de *Vitex polygama* apresentaram potente ação inibitória sobre a desgranulação mastocitária, bem como sobre a liberação de histamina.
- c. A fração química acetato de etila de *P. mucronata* inibiu significativamente a liberação de histamina pelos mastócitos *in vitro*.
- d. As frações químicas acetato de etila e butanol de *Vitex polygama* inibiram significativamente a liberação de histamina pelos mastócitos, *in vitro*.
- e. Sugere-se que as possíveis substâncias químicas presentes na espécie *Passiflora mucronata* que possam estar associadas ao efeito inibitório sobre a desgranulação e liberação de histamina por mastócitos são os flavonoides, sendo componentes majoritários desse extrato.
- f. Sugere-se que as possíveis substâncias químicas presentes na espécie *Vitex polygama* que possam estar associadas ao efeito inibitório sobre a desgranulação e liberação de histamina por mastócitos são os flavonoides, dentre eles a vitexina, orientina e quercetina e, os taninos.
- g. A atividade antialérgica dos extratos e suas frações, bem como a ausência de predisposição tóxica dos extratos, sugerem que produtos provenientes dessas espécies vegetais podem ser potencialmente úteis no tratamento ou prevenção das desordens alérgicas ou outras condições relacionadas à secreção de mastócitos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. Cellular and Molecular Immunology. **W. B. Saunders**, Philadelphia, 4 ed, p.553 , 2000.

ARAÚJO, Adriano Cressoni. **Prospecção biomonitorada de inibidores da secreção de histamina obtidos a partir dos extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (Fabaceae)**. 2013. 90f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

ARIMA M., FUKUDA T. Prostaglandin D2 receptors DP and CRTH2 in the pathogenesis of asthma. **Curr Mol Med**, v. 8, p. 75-365, 2008.

ALVES, C. Q, et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 10, p.2202-2210, out. 2010.

BARNES PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. **Immunol Rev**, v. 242, p. 31-50, 2011.

BROWN, T.T.; SUTER, M.M.; SLAUSON, D.O. Immunopathology. In: SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3 ed. St Louis: Mosby, Cap. 5. p. 246-297, 2002.

BAUDH, K. S., R. P. Differential toxicity of cadmium to mustard (*Brassica juncea* L.) genotypes under higher metal levels. **Journal of Environmental Biolog**, India, v. 32, p. 355- 362, 2011.

BIERLORY, L. Complementary and alternative interventions in asthma, allergy and immunology. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v.93, p. 545-554, 2004.

CRIADO, P.R.; MARUTA, C.W.; CRIADO, F.R.J.; FILHO, C.D.M. Histamina, Receptores de histamina e anti-histaminicos: Novos conceitos. *An Bras Dermatol.* v.85, p.195-210, 2010.

CROFT M., DUAN W., CHOI H., EUN S.Y., MADIREDDI S., METHA A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. **Trends Immunol**, V. 33, p. 144–52, 2012;

CHARLESWORTH, E.N. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. **Allergy: European Journal of Allergy & Clinical Immunology**, Supplement, v. 52, n.34, p.31-43, 1997.

CAMPANHA, S. M. A., FREIRE, L. M. S., FONTES, M. J. F. O impacto da asma, da rinite alérgica e da respiração oral na qualidade de vida de crianças e adolescentes. **Revista CEFAC**, São Paulo, v. 10, n.4, p. 513-519, out-dez, 2008.

CHIRIBOGA, X.; DI STASI, L.C. Material Vegetal. In: Calero, M.J.M.; Froehner, B.B. (Org.). Manual de técnicas experimentales utilizadas en el estudio preclinico de fármacos con actividad gastrointestinal. **Sevilla: Imprensa Sand -CYTED**, v. 1, p. 13-32, 2006..

CÓRDOVA K.R.V., GAMA T.M.M.T.B, WINTER C.M.G., NETO G.K, FREITAS R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Bol Cent Pesq Proc Alim**, n.23, p.221-230, 2005.

CHIRUMBOLO, S. The role of quercetin , flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. **Inflammation & Allergy-drug Targets**, V. 9, p.263-285, 2010.

DE OLIVEIRA, D.M., LUCHINI A.C., SEITO, L.N., GOMES, J.C., CRESPO-LÓPEZ, M.E., DI STASI, L.C., *Cordia verbenaceae* and secretion of mast cells in different animals species. **J. Ethnopharmacol.** V.135, n.2, p. 8-463, 2011.

DVORAK AM. Piecemeal degranulation of basophils and mast cells is effected by vesicular transport of stores secretory granule contents. **Chem Immunol Allergy** V. 85, p. 135-184, 2005.

DEVI N.S., DOBLE M.. Leukotriene c4 synthase: upcoming drug target for inflammation. **Curr Drug Targets**, v. 13, p.18-1107, 2012.

DI STASI, L.C. Na integrated approach to identification and conservation of medicinal plants in the tropical forest – a Brazilian experience. In: LAVANIA, U.C.; SIMMONDS, M. S.J. **Plant Genetic Resources Characterization and Utilization**. Wallingford: CABI Publishing, Cambridge, v. 3, p.1999, 2005.

FERRY, X.; EICHWALD, V.; DAEFFLER, L.; LANDRY, Y. Activation of subunits of Gi2 and Gi3 proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipase C<sub>2</sub> and arachidonate release through phospholipase C in mast cells. **The Journal of Immunology**, v.167, p.13 - 4805, 2001.

FARIAS, V. **ANATOMIA FOLIAR DE *Passiflora* L. (PASSIFLORACEAE): ASPECTOS TAXONÔMICOS E EVOLUTIVOS**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GOLKAR, L.; BERNHARD, J.D. Mastocytosis. **The Lancet**, Londres, v. 349, p. 1379-1385, 1997.

GILFAN, A. M., AUSTIN, S. J, METCALFE, D. D. Mast cell biology: Introduction and overview. **Adv Exp Med Biol**, EUA, v 716, p. 2–12, 2012.

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

GALLI, S.J. Mast cells and basophils. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n.1, p.32-39, 2000.

HEIM, K.E., TAGIAFERRO, A.R., BOBILYA, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structureactivity relationships. **J Nutr Biochem**, v.13, p.572-584, 2002.

HE, S., ZHENG, J. Stimulation of mucin release from airway epithelial cells by mast cell chymase. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, P.32-827, 2004.

HE, S., ZHANG, H., ZENG, X., YANG, P. Self-amplification mechanisms of mast cell activation: a new look in allergy. **Curr Mol Med**, v.12, p.39-1329, 2012.

HOSSAIN, M. A., et al. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**. Nizwa, P. O, 9 ed, v. 3, p. 705-710, set. 2013.

IBIAPINA, C.C., et al. Rinite alérgica: aspectos epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos. **J. bras. pneumol**, São Paulo , v. 34, n. 4, Abril 2008.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology: The immune system in health and disease**, New York: Garland, 5 ed., p.732, 2001.

KIM, S.; JUN, C.; SUK, K.; CHOI, B.; LIM, H.; PARK, S.; HO LEE, S.; SHIN H.; DAE-KEUN, K.; TAE-YONG, S. Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. **Toxicological sciences.**, v. 91, p.123–131, 2006.

KOBORI, C.N., JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Cien Agrotec**, v.29, P. 1008 – 1014, 2005.

LI et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid composition of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, P.1085-1090, 2011.

LANTTO, T. A.; DORMAN, H.J. D.; SHIKOV , A. N.; POZHARITSKAYA , O. N.; MAKAROV , V.G.; TIKHONOV , V. P.; HILTUNEN, R.; RAASMAJA, A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. **Food Chemistry**, v. 112, p. 936–943, 2009.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**. v. 77, p. 1033-1079. 1997.

MOLDENKE, H.N. Materials toward a monograph of the genus *Vitex*. *Phitologia*, v.6 n. 2, p. 80-89, 1957.

MEYER, M.C., CREER, M.H., McHOWAT, J. Potential role for mast cell tryptase in recruitment of inflammatory cells to endothelium. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 289, p. 91-1485, 2005.

MELVIN, D.M., BROOKE, M.M. Triton X-100 in Giemsa staining of blood para-sites. **Stain Technol**, v. 30, p. 75-269, 1955.

OLIVEIRA, M. **Avaliação do potencial antialérgico de flavonoides: estudo sinérgico e influência de sistemas lisossomais**.2013. 136f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

OLIVEIRA, Déborah Mara Costa de. **Triagem de cinco espécies de plantas medicinais usadas na Amazônia através da análise de secreção de histamina**. 2013. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.



OSCHATZ, C. et al., Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation *in vivo*. **Immunity**, v. 34, p. 68-258, 2011.

PRUSSIN C., METCALFE D.D. 4. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. **J The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 486-494, 2003.

PARK, H.; LEE, S.; SON, H.; PARK, S.; KIM, S.; CHOI, E.; THOUDAM, S.K.; SINGH, J.; LEE, M.; KIM, J.; HYUN, M.C.; KWON, T.K.; KIM, Y.H.; KIM, S. Flavonoids Inhibit Histamine Release and Expression of Proinflammatory Cytokines in Mast Cells. **Archives of Pharmacal Researches**, v. 31, p.1303-1311, 2008.

RANG H.P., DALE M.M., RITTE J.M., MOORE P.K. Farmacos antiinflamatórios e imunossupressores. In: Rang HP. Farmacologia (tradução). Elsevier, Rio de Janeiro, 5 ed., p. 272-273, 2004.

RONNBERG, E., MELO, F.R., PEJLER, G. Mast cell proteoglycans. **J Histochem Cytochem**, v. 60, p. 62-950, 2012.

STONE, K.D., PRUSSIN, C., METCALFE, D.D., IgE, mast cells, basophils and eosinophils. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, V.125, p. 73-80, 2010.

SCHOEDER, J.T., CHICHESTER, K.L., BIENEMAN, A.P. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. **J Immunol**, v. 182, p. 9-2432, 2009.

SHAO-HENG, H.E., et al. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.34, p. 1270–1283, 2013.

TAUR, D.J, PATIL, R. Mast Cell Stabilizing, Antianaphylactic and Antihistaminic Activity of *Coccinia grandis* Fruits in Asthma. **Chinese Journal Of Natural Medicines**. Malegaon, 5 ed., v. 9 p. 359-362, 2011.

TAKEMURA, O.S., BANNO, Y., NOZAWA, Y. Inhibition of N-formylmethionyl - leucyl - phenylalanine - stimulated tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation by quercetin in rabbit neutrophils. **Biochem Pharmacol.** V. 46, p.103-107, 1997.

THURMOND, R.L.; GELFAND, E.W.; DUNFOND, P.J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: The search for new antihistamines. **Nature reviews.** v.7, p.41-53, 2008.

TSCHOPP, C.M., SPIEGL, N., DIDICHENKO, S., LUTMANN, W., JULIUS, P., VIRCHOW, J.C., *et al.* Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. **Blood**, v. 108, p. 9-2290, 2006.

WEDEMEYER, J.; GALLI, S.J. Mast cells and basophils in acquired immunity. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 56, p. 936-955, 2000.

WOHLMUTH, *et al.* Pharmacognosy and Chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 6, p. 1015-1018, 2010.

YOO, J.M., KIM, J.H., PARK, S.J., KANG, Y.J., KIM, T.J. Inhibitory effect of eriodictyol on IgE/Ag-Induced type I hypersensitivity. *Biosci.* **Biotechnol. Biochem**, v. 76, n. 7, p. 1285-1290, 2012.

ZERAIK, M.L., YARIWAKE, J.H. **Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener).** 2010. 191 f. – Tese (Doutorado), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010