



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



Atividade antialérgica das plantas *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* presentes na Restinga de Jurubatiba

RENATA LADEIRA DE LUCENA

Macaé
Junho de 2015

RENATA LADEIRA DE LUCENA

Atividade antialérgica das plantas *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* presentes na Restinga de Jurubatiba

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. Dr.^a Elaine dos Anjos da
Cruz

Macaé
Junho de 2015

LUCENA, R. L.

Atividade antialérgica das plantas *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* presentes na Restinga de Jurubatiba / Macaé, RJ, 2015.

Orientadora: Elaine dos Anjos da Cruz

58 páginas

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, minha fonte de força e coragem para alcançar esse objetivo.

Aos meus amados pais, que são exemplos de persistência e determinação. Agradeço por todo amor, paciência, cuidado, proteção e incentivo em todos os anos da minha vida.

Aos meus queridos irmãos, pessoas que eu tanto admiro e busco inspiração. Agradeço pela amizade, carinho e preocupação dispensados.

Ao Leonardo, que muito me ajudou nessa longa caminhada e esteve presente em tantos momentos essenciais.

Aos meus grandes amigos, Tamiris, Mariana, Daniel, Glauber, Thiago, Jordean, Patriny, agradeço pelos momentos de descontração e por entenderem meus momentos de ausência.

À minha querida orientadora, obrigada pelos ensinamentos, amizade, incentivo, atenção durante esse período e oportunidade em desenvolver esse estudo.

Às minhas colegas do laboratório de Produtos Bioativos (LPBio), Yorhana, Isabella e Emily, obrigada pela ajuda durante os experimentos e pela ótima companhia. Agradeço também à bioterista Laura, pelo cuidado e preocupação com o bem-estar dos animais.

Às minhas amigas, Mariana, Arielly, Pollyana, Fernanda e Nívia, agradeço pelos anos de convivência durante a vida acadêmica, pela amizade, companheirismo e cumplicidade que criamos dentro e fora da universidade.

Aos meus amados avós, tios e primos, agradeço pelas orações, pela torcida e por se tornarem presentes mesmo à distância.

Dedico este trabalho a vocês, que com gestos e momentos simples tornaram a minha vida melhor e alegraram meus dias, quando traziam sorrisos, abraços e palavras amigas. Tudo isso permitiu que a caminhada até aqui fosse mais fácil. Muito obrigada!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Stachytarpheta schottiana</i> no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.....	24
Figura 2. Detalhe da inflorescência de <i>Stachytarpheta crassifolia</i>	24
Figura 3. Imagem de <i>Kielmeyera membranacea</i>	26
Figura 4. Etapas da partição líquido/líquido a partir dos extrato brutos.	29
Figura 5. Avaliação da citotoxicidez dos extratos brutos de <i>Stachytarpheta schottiana</i> , <i>Stachytarpheta crassifolia</i> e <i>Kielmeyera membranacea</i>	35
Figura 6. Atividade concentração-dependente de <i>Stachytarpheta schottiana</i>	36
Figura 7. Atividade concentração-dependente de <i>Stachytarpheta crassifolia</i>	37
Figura 8. Atividade concentração-dependente de <i>Kielmeyera membranacea</i>	38
Figura 9. Avaliação dos extratos brutos de <i>Stachytarpheta schottiana</i> , <i>Stachytarpheta crassifolia</i> e <i>Kielmeyera membranacea</i> sobre a liberação de histamina <i>in vitro</i>	39
Figura 10. Avaliação do efeito das frações de <i>Stachytarpheta crassifolia</i> e <i>Kielmeyera membranacea</i> sobre a liberação de histamina <i>in vitro</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes receptores da histamina quanto a sua localização.....	18
---	----

LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA – Análise de variância

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

CD4+ – Marcador de diferenciação do linfócito T auxiliar (*Cluster of differentiation 4*)

CD40 – receptor coestimulador de CD40 ligante (cluster of differentiation 40)

D.O. – Densidade óptica

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DNP – Dinitrofenol

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

FC ϵ RI – Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E

FMS – Fenasina metossulfato

Fr. AcoEt – Fração de acetato de etila

Fr. BuOH – Fração butanólica

H₁ – Receptor de histamina 1

H₂ – Receptor de histamina 2

H₃ – Receptor de histamina 3

H₄ – Receptor de histamina 4

HRP – Horseradish peroxidase

Ig - Imunoglobulina

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

LaProN – Laboratório de Produtos Naturais

LDH – Enzima lactato desidrogenase (*lactate dehydrogenase*)

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

PARNA – Parque Nacional

PNRJ – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

PBS – Tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*)

QE – Quercetina

TH₂ – Linfócito T auxiliar do subgrupo 2 (*T helper 2*)

TMB – Tetrametil benzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrose factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Doenças alérgicas.....	11
1.2. Fatores de risco e natureza dos antígenos	12
1.3. O papel das células T _H 2 e células B	14
1.4. O papel dos mastócitos na hipersensibilidade imediata.....	15
1.4.1. Propriedades dos mastócitos.....	15
1.4.2. Ligação da IgE aos mastócitos através do receptor FcεRI	15
1.4.3. Ativação dos mastócitos e liberação de mediadores	16
1.5. Histamina: substância mediadora do processo alérgico	17
1.6. Terapia medicamentosa convencional	19
1.7. Os produtos naturais como fonte alternativa de novas substâncias antialérgicas.....	21
1.7.1. Substâncias de origem vegetal com atividade terapêutica	22
1.8. Biodiversidade do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.....	23
1.8.1. <i>Stachytarpheta schottiana</i> e <i>Stachytarpheta crassifolia</i>	24
1.8.2. <i>Kielmeyera membranacea</i>	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. OBJETIVO GERAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Coleta do material vegetal.....	30
4.2. Preparo dos extratos hidroalcoólicos de <i>Stachytarpheta schottiana</i> , <i>Stachytarpheta crassifolia</i>	30
4.3. Preparo do extrato etanólico de <i>Kielmeyera membranacea</i>	30
4.4. Preparo das frações de <i>Stachytarpheta schottiana</i> , <i>Stachytarpheta</i> <i>crassifolia</i> e <i>Kielmeyera membranacea</i>	31
4.5. Animais	32
4.6. Isolamento de macrófagos peritoneais.....	32
4.7. Avaliação de citotoxicidade dos extratos brutos de <i>Stachytarpheta</i> <i>schottiana</i> , <i>Stachytarpheta crassifolia</i> e <i>Kielmeyera membranacea</i> em macrófagos peritoneais.....	32
4.8. Dosagem de LDH.....	33
4.9. Ensaio de desgranulação de mastócitos mesenteriais <i>ex vivo</i>	33

4.10.	Isolamento de mastócitos peritoneais	34
4.11.	Indução da liberação de histamina <i>in vitro</i>	34
4.12.	Quantificação de histamina liberada <i>in vitro</i> , a partir da ativação de mastócitos peritoneais	35
4.13.	Análise estatística	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1.	Avaliação de citotoxicidez	36
5.2.	Ensaio de desgranulação de mastócitos mesenteriais <i>ex vivo</i>	37
5.3.	Quantificação de histamina liberada <i>in vitro</i>	40
6.	CONCLUSÃO	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

Os mastócitos possuem papel central nas reações de hipersensibilidade imediata, através da liberação de mediadores químicos, como a histamina. Estas reações podem culminar no surgimento da asma, rinite, dermatite atópica e alergias alimentares. Como terapia convencional, temos o uso de anti-histamínicos, agonistas β 2-adrenérgicos, agonistas α -adrenérgicos, que podem gerar efeitos adversos, como: sonolência ou agitação, diminuição da concentração, alterações de memória e da coordenação psicomotora. Estudos com produtos naturais vem sendo realizados a fim de encontrar novos candidatos a fármacos ou, protótipos para medicamentos, com menos efeitos adversos e menor custo. O presente estudo visa avaliar a atividade antialérgica de extratos das plantas *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* e suas frações de diferentes polaridades, através da inibição da desgranulação de mastócitos *ex vivo* e quantificação de histamina liberada *in vitro*, a partir da ativação de mastócitos. No ensaio de desgranulação de mastócitos *ex vivo*, estes extratos foram avaliados nas concentrações 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, utilizando-se membranas do mesentério de ratos Wistar ricas em mastócitos, sensibilizadas com anticorpo IgE anti-DNP (0,001 mg/mL) e tratadas com os extratos vegetais, o flavonoide quercetina (0,1 mg/mL) ou solução tampão salina (PBS, grupo controle). Foi realizado o desafio utilizando antígeno DNP (0,0001 mg/mL) e corou-se as membranas com Azul de Toluidina para a contagem de mastócitos intactos e desgranulados em microscópio óptico. Os extratos brutos quando comparados ao grupo controle positivo (sensibilizado, não tratado, desafiado) com $71 \pm 5,65\%$ de mastócitos desgranulados, foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,01$) a desgranulação de mastócitos de forma concentração-dependente, sendo *Stachytarpheta schottiana*: $5 \pm 4,24\%$, $14 \pm 4,24\%$ e $26 \pm 4,24\%$ de mastócitos desgranulados nas três concentrações de uso, respectivamente; *Stachytarpheta crassifolia*: $23 \pm 1,41\%$, $29 \pm 4,24\%$ e $38 \pm 2,82\%$ de mastócitos desgranulados nas três concentrações de uso, respectivamente, e controle positivo com $87 \pm 4,24\%$; e *Kielmeyera membranacea*: $23 \pm 1,41\%$, $33 \pm 1,41\%$ e $35 \pm 1,41\%$ de mastócitos desgranulados nas três concentrações de uso, respectivamente, e controle positivo com $98 \pm 2,82$. Para a quantificação de histamina liberada *in vitro*, cultivou-se mastócitos peritoneais de ratos Wistar, sensibilizados com IgE anti-DNP (0,5 μ g/mL), e tratados com: a) extratos vegetais brutos (0,5 mg/mL) b) frações químicas (0,1 mg/mL) e c) quercetina (0,1 mg/mL), com desgranulação pela adição de: a) antígeno DNP (0,05 μ g/mL), b) composto 48/80 (0,5 μ g/mL) ou lise total com ácido perclórico (0,4 N). Coletou-se o sobrenadante obtido para a quantificação de histamina por método colorimétrico em ELISA. Os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,01$) a liberação de histamina, com $13,56 \pm 2,21$ ng/mL; $23,07 \pm 2,63$ ng/mL e $38,76 \pm 4,68$ ng/mL de histamina liberada, respectivamente, quando comparados ao grupo controle positivo ($82,68 \pm 0,41$ ng/mL). As frações de diferentes polaridades testadas também apresentaram efeito inibitório significativo ($p < 0,01$), quando comparadas ao controle positivo ($72,68 \pm 0,69$ ng/mL), sendo fração butanólica de *Stachytarpheta crassifolia* = $12,19 \pm 1,10$ ng/mL e fração acetato de etila = $8,17 \pm 0,97$ ng/mL. Já, *Kielmeyera membranacea* apresentou $22,49 \pm 0,69$ ng/mL e $26,11 \pm 0,83$ ng/mL, para as frações butanólica e acetato de etila, respectivamente. Sugere-se, então que as espécies vegetais estudadas apresentam uma possível atividade antialérgica associada à inibição da desgranulação e liberação de histamina pelos mastócitos. As substâncias presentes nas frações acetato de etila e butanólica parecem ser responsáveis por esse efeito terapêutico.

Palavras-chave: mastócitos; atividade antialérgica; histamina; Restinga de Jurubatiba

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças alérgicas

As reações alérgicas são o distúrbio mais comum da imunidade, afetando cerca de 22% da população mundial. Apresentam características comuns, diferenciando-se nos tipos de antígenos que favorecem o desenvolvimento da alergia e suas manifestações clínicas e patológicas. Dentre os agentes desencadeantes temos: os aeroalérgenos, que incluem as proteínas do pólen, os ácaros da poeira doméstica (*Dermatophagoides pteronyssinus*), pelos de animais domésticos, baratas e fungos; e alérgenos alimentares, como o ovo, leite, trigo, soja e amendoim. Além destes, há ocorrência de alergia devido o uso de alguns medicamentos como o antibiótico penicilina (WARNER *et. al*, 2006; FERREIRA *et. al*, 2014).

A sintomatologia depende do modo em que o antígeno invade o organismo, podendo envolver a pele (gerando eczema), os olhos (resultando em conjuntivite), pode ainda acometer a nasofaringe tendo como consequência a rinite, o trato gastrointestinal gerando gastroenterites, ou os tecidos broncopulmonares culminando na asma (BELLIK *et. al*, 2013).

A alergia do tipo I, também denominada hipersensibilidade imediata mediada por anticorpos do tipo IgE, corresponde a uma patologia iniciada pela introdução de um antígeno alergênico no organismo, que estimula a ativação de células T auxiliares tipo 2 (T *helper* 2, T_{H2}) e a produção de anticorpo IgE alérgeno-específico pelos linfócitos B, como consequência da primeira exposição ao alérgeno. O anticorpo IgE sensibiliza os mastócitos ligando-se ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) presente na superfície destas células. A exposição repetida ao alérgeno leva a ativação dos mastócitos sensibilizados, com consequente liberação de mediadores químicos responsáveis pelas reações patológicas da hipersensibilidade imediata, dentre as quais temos o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e contração do músculo liso brônquico e visceral. Esta reação possui início após poucos minutos do estímulo e pode gerar variadas consequências patológicas (ABBAS *et. al*, 2011; CRUZ, 2006).

1.2. Fatores de risco e natureza dos antígenos

O aumento na prevalência das doenças alérgicas foi observado em países que passaram por um rápido crescimento econômico desde a segunda metade do século XX. Estudos apontam que habitantes de zonas urbanas possuem um maior nível de doenças alérgicas quando comparados a habitantes de áreas rurais. Tal fato pode ser explicado pela maior exposição a fatores de risco, como poluição e menor exposição a micro-organismos benéficos (FOGARTY, 2015; CALVERT *et. al*, 2005; MUSAFIRI *et. al*, 2011; VIINANEN *et. al*, 2005; MUSTAPHA *et. al*, 2013).

Os alérgenos responsáveis pelas reações de hipersensibilidade imediata são proteínas ou substâncias químicas ligadas a proteínas. Embora não exista uma característica estrutural de uma proteína que possa defini-la como alergênica, há características comuns referentes à natureza química do alérgeno. Com base no tamanho, há os que possuem baixo peso molecular (LMW, < 1000 kD), incluindo haptenos e outras pequenas moléculas e há os de alto peso molecular (HMW, >1000 kD), estes últimos são ainda subclassificados como derivados de planta ou animal, incluem proteínas e alérgenos não-proteicos. Outras características importantes dessas substâncias são estabilidade, glicosilação e alta solubilidade nos fluidos corporais. As respostas anafiláticas induzidas por alimentos são normalmente causadas por proteínas pequenas e altamente glicosiladas. Tais características podem proteger os antígenos da desnaturação e da degradação no trato gastrointestinal, permitindo a absorção destes de forma intacta. Alguns medicamentos, como a penicilina podem causar fortes respostas de IgE, pois reagem quimicamente com os resíduos de aminoácidos nas próprias proteínas para formar conjugados hapteno-carreador. Desta forma, estes estimulam respostas de linfócitos T_H2 e produção de IgE (MOREIRA, 2006; BARDANA, 2003; QUIRCE e BERNSTEIN, 2011).

A modernização das sociedades desencadeou alterações nos hábitos alimentares e estilo de vida, configurando o denominado estilo de vida ocidental contemporâneo. A alimentação tornou-se rica em gordura, açúcares e alimentos refinados. Em contrapartida, alterações na esfera do trabalho, lazer e do modo de vida moderno contribuem na redução da atividade física e a adesão ao estilo de vida sedentário. Estudos apontam que há relação entre a obesidade e a ocorrência da

asma. A obesidade é considerada um fator de risco, porque pode determinar o desenvolvimento de doenças crônicas. Por outro lado, os sintomas da asma como falta de ar e dor no peito dificultam as atividades cotidianas conduzindo ao sedentarismo. A hipótese desta associação pode estar relacionada à diminuição do calibre das vias aéreas, levando a diminuição da função pulmonar. Além disso, em obesos há a presença aumentada de citocinas pró-inflamatórias e essas substâncias estariam relacionadas às respostas inflamatórias local e sistêmica das vias aéreas. No entanto, os mecanismos que explicam esta observação não estão totalmente elucidados (BEUTHER e SUTHERLAND, 2007; BASSO *et. al*, 2007; WANDERLEY e FERREIRA, 2010).

Depois da pele, o trato respiratório é o órgão mais afetado pela exposição aos fatores ambientais. É o ponto de entrada para uma diversidade de partículas presentes no ar, gases e vapores que podem causar sintomas relacionados à alergia (BARDANA, 2003). A poluição ao ar livre e a causada pela fumaça do tabaco pode contribuir no desenvolvimento da asma, sendo esta condição reconhecida e relatada em uma variedade de estudos. A fonte da poluição varia muito de país para país, dependendo da localização e do estágio do desenvolvimento econômico (VENERO-FERNANDEZ *et. al*, 2013; KUNZLI *et. al*, 2000; GOWERS *et. al* 2012).

O histórico de exposição a antígenos é um fator que determina a quantidade de anticorpos IgE específicos produzidos. A primeira exposição gera a formação de anticorpos específicos para estas partículas. A exposição repetida leva ao estabelecimento de uma reação alérgica e as exposições subsequentes tornam o quadro cada vez mais grave. Isto, porque na reexposição ao antígeno os mastócitos sensibilizados com IgE são ativados e liberam seus mediadores, resultando assim na reação patológica (PIVATO e LOPES, 2012).

A propensão de um indivíduo adquirir alergia é dependente, então, de causas multifatoriais, como: herança genética, natureza dos antígenos, história de exposição ao antígeno, mudança de ambiente, alterações no estilo de vida e hábitos alimentares, condições de higiene, poluição (ABBAS *et. al*, 2011; HUANG *et. al*, 2015; CASAGRANDE *et. al*, 2008).

1.3. O papel das células T_{H2} e células B

As células T auxiliares (T *helper*) CD4⁺ do subgrupo 2 (T_{H2}) quando ativadas secretam IL-4 e IL-13, induzindo a síntese de IgE pelas células B. Este processo tem início pela ação das células dendríticas, que são as principais células apresentadoras de antígeno especializadas na captação, processamento e apresentação de antígenos às células T. Após a exposição ao alérgeno e a sua entrada no organismo as células dendríticas localizadas no epitélio capturam os antígenos e posteriormente migram para os linfonodos de drenagem. Os antígenos são processados nos linfonodos, sendo os peptídeos apresentados a células TCD4⁺ virgens (*naïve*), ou seja, células que ainda não foram estimuladas a se diferenciar em células efetoras. As células T, então diferenciam-se, pela ação de citocinas como a IL-4 (sendo esta a principal) além de IL-5 e IL-13, em células T_{H2} e em células T auxiliares foliculares (T_{FH}), que secretam citocinas do tipo T_{H2} (INCORVAIA *et. al*, 2007; WILLART e HAMMAD H, 2010; ALI, 2010).

As células B são ativadas pelas células T_{H2} e T_{FH}, que através da produção de citocinas, IL-4 e IL-13, e pela ação do ligante CD40 estimulam as células B a mudarem o isotipo de cadeia pesada e assim produzirem IgE. Esta imunoglobulina específica para alérgeno entra na circulação sanguínea e se liga ao seu receptor FcεRI presente na superfície de mastócitos, sensibilizando-os e preparando-os para reagir a um posterior encontro com o alérgeno (KOYASU e MORO, 2011).

Além disso, as células T_{H2} estão envolvidas em outros componentes da reação de hipersensibilidade imediata, sendo capazes de ativar eosinófilos através da liberação de IL-5, liberando IL-13 e estimulando as células epiteliais a secretarem quantidades elevadas de muco, por exemplo, nas vias aéreas (ABBAS *et al.*, 2011).

As citocinas liberadas pelas células T_{H2} (IL-4, IL-13) levam a mudança do isotipo de cadeia pesada para a classe IgE nas células B. Sabe-se que indivíduos normais sintetizam outros isotipos de Ig, como IgM e IgG, e pequenas quantidades de IgE. Enquanto, indivíduos que apresentam alergia, geralmente, possuem níveis séricos de IgE elevados em resposta a alérgenos ambientais. Esta imunoglobulina contém a cadeia pesada ε, sendo considerada a mais eficiente na ligação aos receptores Fc dos mastócitos e ativação deste tipo celular. (ABBAS *et. al*, 2011; HUANG *et. al*, 2015; CASAGRANDE *et. al*, 2008).

1.4. O papel dos mastócitos na hipersensibilidade imediata

1.4.1. Propriedades dos mastócitos

Os mastócitos representam o principal tipo celular responsável pela resposta alérgica em diferentes tecidos, são derivados de progenitores pluripotentes hematopoiéticos da medula óssea (CD34+) e são liberados na circulação ainda imaturos. Migram para regiões vascularizadas do corpo (pele, pulmão, mucosa e submucosa intestinal), sendo os locais mais comuns de reações de hipersensibilidade imediata. Os mastócitos não são encontrados na circulação sanguínea, completam o processo de diferenciação sob a influência de fatores de crescimento e citocinas produzidas em cada tecido onde são encontrados. Os mastócitos encontram-se geralmente adjacentes aos vasos sanguíneos e linfáticos, nas mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e sob o epitélio, onde são expostos a antígenos ambientais. Morfologicamente apresentam forma variada e possuem núcleos arredondados. Além disso, possuem grânulos citoplasmáticos, que armazenam mediadores químicos, tais como a histamina, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, substâncias indutoras da inflamação (MAYR *et al.*, 2003; ROBBIE-RYAN e BROWN, 2002).

1.4.2. Ligação da IgE aos mastócitos através do receptor FcεRI

Os mastócitos expressam na superfície da membrana de suas células receptores de alta afinidade para cadeias pesadas do tipo ϵ , denominados FcεRI que se ligam ao anticorpo IgE. Quando ocorre a ligação entre a IgE e este receptor, a imunoglobulina possui a função de ser um receptor de antígeno na superfície dos mastócitos (GALLI, 2000; ABBAS *et al.*, 2011).

A afinidade entre o receptor FcεRI e a IgE é considerada muito alta (constante de dissociação [K_d] de cerca de 1×10^{-10} M), muito superior do que qualquer outro receptor Fc para seu ligante de anticorpos. Altos níveis desse receptor são restritos aos mastócitos e basófilos, enquanto baixos níveis são detectados em células dendríticas, monócitos, eosinófilos e aproximadamente 30% das células B (WE-DEMEYER e GALLI, 2000).

A produção de IgE é favorecida pela exposição a certos tipos de antígenos, assim como vias específicas de apresentação de antígenos ao sistema imune. A maior parte da IgE localiza-se nos tecidos e está ligada aos mastócitos pelo FcεRI. Estima-se a presença de 10^4 a 10^6 receptores por mastócitos e a desgranulação ocorre com a agregação de 1 a 15% desses receptores. Quando a IgE está conjugada aos mastócitos possui meia-vida de 11 a 12 dias. Contudo, quando se encontra livre no soro, seu tempo de meia-vida é reduzido a 2 dias (RECH e GRAÇA, 2006).

A ligação cruzada dos antígenos com IgE pré-formada ligada ao receptor FcεRI dos mastócitos produz a liberação e síntese de uma série de mediadores pela ativação de diversas tirosino-quinases (KAWA-KAMI, 2002).

1.4.3. Ativação dos mastócitos e liberação de mediadores

Os mastócitos são células efetoras das respostas alérgicas. A liberação de mediadores pelos mastócitos pode ocorrer através de dois mecanismos diferenciados, sendo dependente de IgE ou através de mecanismos independentes, não imunológicos (MARONE *et.al*, 2005; CK e CHEN, 2003; VLIAGOFTIS e BEFUS, 2005).

O mecanismo predominante em reações alérgicas é dependente de IgE e ocorre pela ligação desse anticorpo, produzido pelas células B, ao receptor de alta afinidade (FcεRI) presente na membrana dos mastócitos. Em uma subsequente exposição ao mesmo alérgeno, estas imunoglobulinas podem reconhecê-lo, resultando na reação cruzada, ativação da desgranulação dos mastócitos e liberação das substâncias pró inflamatórias (AMIN, 2012; ABBAS *et al.*, 2011).

Um segundo mecanismo de ativação de mastócitos ocorre através de estímulos não imunológicos, por fatores físicos (trauma mecânico, temperatura elevada), toxina, venenos, mediadores endógenos (proteínas e proteases teciduais), pela ligação direta de neuropeptídeos, componentes do sistema complemento e algumas drogas (METCALFE *et al.*, 1997).

Após a ativação dos mastócitos, podem ocorrer a liberação de substâncias químicas que possuem funções biológicas diferenciadas. Esse processo pode culminar em três respostas biológicas, sendo elas: secreção por exocitose de mediadores pré-formados e estocados em grânulos citoplasmáticos (também denominada desgranulação), incluindo histamina, triptase, quimase e heparina;

síntese de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas; e síntese e secreção de citocinas e quimiocinas, dentre elas podemos destacar o fator de necrose tumoral (TNF), IL-4, IL-13. Esses grupos de mediadores pró-inflamatórios causam danos patológicos e manifestações clínicas, após a ativação de mastócitos (KALESNIKOFF e GALLI, 2010; HENNINO *et. al*, 2006; FERREIRA, 2005).

A desgranulação de mastócitos compreende um componente central de todas as doenças alérgicas. Os sintomas apresentados dependem dos tecidos em que os seus mediadores liberados exercem seus efeitos, bem como da cronicidade do processo inflamatório resultante. As formas mais comuns de doenças alérgicas são a rinite alérgica, asma brônquica, dermatite atópica e alergias alimentares (ABBAS *et al.*, 2011).

1.5. Histamina: substância mediadora do processo alérgico

A histamina pertence à classe das aminas biogênicas e se encontra armazenada nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos, sendo liberada após a ativação da célula. Apresenta baixo peso molecular e contém um grupo amina. Provavelmente, a histamina é a principal substância mediadora da resposta alérgica, uma vez que apresenta maiores concentrações teciduais após a desgranulação. Atua ligando-se aos seus receptores na célula-alvo, havendo diferentes tipos de células que expressam quatro subtipos de receptores para a histamina: H₁, H₂, H₃ e H₄ (conforme descrito na tabela 1). Todos pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e podem ser diferenciados pelo local onde são encontrados e sensibilidade aos diferentes inibidores farmacológicos. O receptor H₁ é codificado no cromossomo humano 3, sendo o responsável por muitos sintomas das doenças alérgicas, tais como o prurido, a rinorreia, o broncoespasmo e a contração da musculatura lisa intestinal (JUTEL e AKDIS, 2005; MAINTZ e NOVAK, 2007; LEURS *et. al*, 2002; CRIADO *et. al*, 2005; CRIADO *et. al*, 2010; THURMOND *et. al*, 2008).

Tabela 1: Diferentes receptores da histamina quanto a sua localização.

Tipo de receptor histamínico	Localização
H₁	Distribuídos em uma variedade de tecidos, SNC, músculos lisos, sistema cardiovascular, células endoteliais e linfócitos.
H₂	São principalmente expressos em músculos lisos vasculares, vias aéreas, endotélios, hepatócitos e principalmente em células parietais.
H₃	São predominantemente encontrados no cérebro, onde possuem função de receptores pré-sinápticos, modulando a liberação de diversos neurotransmissores, incluindo a própria histamina.
H₄	São encontrados principalmente em células de origem hematopoiéticas, como células dendríticas, mastócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos e células T. Além disso, são consideravelmente expressos no cérebro, tecidos nervosos, medula óssea e leucócitos. Nos pulmões, intestino delgado, cólon e coração apresentam expressão moderada.

A histamina compõe mais de 10% do conteúdo total do mastócito, sendo responsável por diversos efeitos pertinentes a respostas alérgicas. É considerada um mediador vasoativo e espasmogênico, pois induz o aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de muco, contração do músculo liso das vias aéreas e broncoconstrição aguda. Também pode promover a quimiotaxise de leucócitos, produção de prostaglandinas, secreção ácida gástrica e imunorregulação (FERREIRA, 2011; CRIADO *et. al* , 2005; CRUZ, 2006).

A histamina, após a ligação ao endotélio, gera a contração das células endoteliais e abertura dos espaços entre as células, que leva ao aumento da permeabilidade vascular e vazamento do plasma dentro dos tecidos. Além disso, estimula as células endoteliais a sintetizarem substâncias que provocam o

relaxamento da musculatura lisa vascular, tais como a prostaciclina (PGI₂) e o óxido nítrico, que provocam a vasodilatação. Estas ações levam a formação da pápula e halo eritematoso. Como a histamina também provoca a constrição do músculo liso intestinal e dos brônquios, pode contribuir para o aumento do peristaltismo e do broncoespasmo associados aos alérgenos ingeridos e inalados, respectivamente. Os anti-histamínicos ou antagonistas do receptor H₁ podem inibir a formação da pápula e do halo eritematoso. Entretanto, em certas doenças alérgicas como a asma, não são eficazes para suprimir a reação (ABBAS *et al.*, 2011; LOPES e PIVATO, 2012).

É notória a importância da histamina como mediador em inúmeros processos patológicos, bem como seu papel chave em diversas manifestações clínicas. Dentre elas podemos destacar: prurido, eczema, dermatites alérgicas, dermatites de contato, rinite alérgica, asma, alergias alimentares, choque anafilático. Sendo assim, a inibição de sua liberação pode contribuir com a produção de efeitos benéficos, preventivos ou curativos, dessas doenças (JUTEL *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2000).

1.6. Terapia medicamentosa convencional

As doenças alérgicas podem causar impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes, visto que a patologia e/ ou sua terapêutica podem gerar certo grau de limitação e desconforto ao paciente, levando a redução da sua disposição física, vigor e habilidade para realizar atividades rotineiras. Essas doenças podem se tornar condições crônicas de alta prevalência entre crianças e adultos. Apesar de não apresentarem alta letalidade, possuem elevado custo social e econômico, seja pela grande utilização dos serviços de saúde ou pelo prejuízo oriundo da falta ao trabalho e absenteísmo escolar a elas associados (SILVA *et. al*, 2000).

A asma brônquica pode ser definida como uma síndrome inflamatória crônica de elevada prevalência mundial, caracterizada por inflamação das vias aéreas, obstrução ao fluxo de ar e hiperresponsividade brônquica, levando a episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, sensação de aperto no peito e tosse. No Brasil, estima-se que há mais de 10 milhões de asmáticos. Cerca de 20-30% das crianças e adolescentes das grandes cidades brasileiras apresentam sintomas da doença. Há também uma tendência ao crescimento da morbidade e mortalidade por asma em

vários países, incluindo o Brasil. A rinite é revelada como uma inflamação da mucosa de revestimento nasal, sendo caracterizada pela presença de um ou mais dos seguintes sintomas: congestão nasal, coriza hialina, espirros seguidos e prurido. Os estudos epidemiológicos relacionados à prevalência da rinite alérgica mostram maior prevalência desta doença nos grandes centros urbanos. Estatísticas mundiais apontam uma prevalência de 30 a 40% em crianças e adolescentes e em torno de 40% nos adultos. No Brasil, alguns estudos demonstram uma prevalência de 33% em escolares de 6-7 anos e de 34% na faixa etária de 13 a 14 (CORRÊA *et. al*, 2008; PONTE, 2004; GALVÃO e CASTRO, 2005).

A rinite e a asma são enfermidades frequentemente associadas. Os sintomas nasais ocorrem em 28% a 78% dos pacientes com asma, comparando-se com aproximadamente 20% da população em geral. E cerca de 19% a 38% dos pacientes com rinite alérgica podem ter asma. O tratamento da rinite no paciente asmático pode reduzir as consultas à emergência e internamentos por asma em até 61%. Logo, torna-se importante para o controle e tratamento desta doença (GALVÃO e CASTRO, 2005; ADAMS *et. al*, 2002; CRYSTAL-PETERS *et. al*, 2002).

Com relação às terapias utilizadas na alergia, temos o uso de anti-histamínicos, que eliminam os sintomas como urticária, vermelhidão, rubor e prurido. Porém, o broncoespasmo, hipotensão e edema não são revertidos imediatamente. Logo, outra classe de medicamentos utilizada é a dos agonistas β 2-adrenérgicos, que agem como broncodilatores. Os agonistas α -adrenérgicos atuam como vasoconstritores, reduzindo o edema de mucosa e elevando a pressão arterial. Há também os estabilizadores de membrana de mastócitos para o controle do quadro entre as crises, como por exemplo o cromoglicato dissódico. Apesar de atenuar os sintomas da atopia, a utilização da terapia convencional pode acarretar no aparecimento de efeitos adversos, tais como: incômodo causado pela sedação, sonolência ou agitação, diminuição da concentração, alterações de memória e da coordenação psico-motora (GALVÃO e CASTRO, 2005).

Dessa forma, surge a necessidade da busca por novas estratégias terapêuticas que apresentem ação específica e duradoura, sendo capazes de modular a resposta imune alérgeno-específica e eliminar o processo inflamatório. A intervenção terapêutica na doença alérgica tem sido focada, geralmente, na supressão da produção de IgE e bloqueio da ação da histamina, regulação da expressão e / ou a

liberação de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, e / ou mediadores inflamatórios (BELLIK *et. al*, 2013).

1.7. Os produtos naturais como fonte alternativa de novas substâncias antialérgicas

A natureza destaca-se como fonte de novos agentes com atividade farmacológica para uma grande diversidade de patologias. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. Além disso, houve o crescimento das vendas de produtos medicinais que em 1997 era de aproximadamente US\$ 23 milhões e saltou para US\$ 31 milhões em 2002 (COUTINHO *et. al*, 2009; RASKIN *et al.*, 2002).

O uso popular de plantas medicinais para aliviar os sintomas vem desde os primórdios da humanidade. Há mais de 5000 anos o chá da espécie *Ephedra sinica* já era utilizado por chineses como estimulante e antiasmático. Sabe-se que diversos fármacos já foram isolados de plantas, inclusive para o tratamento de problemas respiratórios como a asma, sendo eles: atropina, teofilina e cromonas. Esse tipo de terapia compreende o uso de fármacos derivados de plantas ou de suas partes. Portanto, o reino vegetal constitui uma fonte valiosa de novos agentes terapêuticos contra a alergia. E, por isso, estudos com espécies vegetais têm sido realizados com o objetivo de encontrar novos agentes terapêuticos que possam atuar como candidatos a fármacos ou, então, como protótipos para novos medicamentos (SCHANEBERG *et al.*, 2003; CORRÊA *et. al*, 2008).

Com mais de 56.000 espécies de plantas, o Brasil tem uma das floras mais ricas do mundo, contando com quase 19% da flora mundial. Nosso conhecimento da ampla biodiversidade ainda é muito incompleto e necessita ser explorado. Há uma ampla variedade de metabólitos secundários de plantas, assim como diversas atividades biológicas a serem estudadas. Essas substâncias pertencem a diferentes classes químicas, o que aumenta a probabilidade de descoberta de novos compostos antialérgicos (GIULIETTI *et. al*, 2005; CORRÊA *et. al*, 2008).

Outro fator que impulsiona a descoberta de novas substâncias oriundas de produtos naturais é a existência de obstáculos que impedem o uso de medicamentos

alopáticos pelas populações carentes, incluindo dificuldade no acesso aos centros de atendimento hospitalares, obtenção de exames e medicamentos. Dessa maneira, o uso de plantas medicinais pode contribuir para um tratamento eficaz, de fácil acesso e com menor custo (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005).

1.7.1. Substâncias de origem vegetal com atividade terapêutica

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que englobam desde moléculas simples até aquelas com alto grau de polimerização. Apesar de não apresentarem importância vital para a planta, são extremamente importantes na sua defesa. A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido amplamente estudada devido as atividades farmacológicas relacionadas as substâncias químicas pertencentes a esse grupo. Dentre estes compostos, podemos citar os flavonoides, fenilpropanoides, cumarinas, que podem ser responsáveis pela atividade antialérgica das plantas medicinais (PRAIA *et al.*, 2014).

Os flavonoides são metabólitos secundários que apresentam diversas funções biológicas tanto para as plantas quanto para os animais. Vários trabalhos relatam atividades antimicrobiana, antiviral, antineoplásica, anti-inflamatória, hepatoprotetora, anti-hipertensiva e hipoglicemiantes. Além disso alguns destes compostos são capazes de apresentarem atividade inibitória sobre a liberação de histamina de mastócitos. Outra característica é a capacidade de estabilizar a membrana de mastócitos e basófilos, prevenindo a liberação de histamina, por isso estão sendo indicados como agentes inibidores da desgranulação de mastócitos, com ação mais potente que alguns medicamentos como o cromoglicolato de sódio. Ou, podem agir impedindo a ligação de moléculas de IgE ao receptor FcεRI (FERREIRA, 2011; OLIVEIRA, 2013).

A rutina e quercetina, são exemplos de flavonoides que ocorrem naturalmente em plantas, apresentam atividade inibitória sobre a liberação de histamina dos mastócitos da cavidade peritoneal de ratos. O mecanismo de ação envolve a diminuição do influxo de cálcio e função de algumas quinases reguladas por sinais extracelulares e relacionadas com a liberação de leucotrienos e prostaglandinas (DURASAMY *et al.*, 2005; CHO *et al.*, 2010; KIMATA *et al.*, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999).

Além disso, os derivados de cumarinas possuem atividade antialérgica bem reportada. Foi demonstrado que a escoparona (6,7-dimetóxi-cumarina) inibiu reações de anafilaxia cutânea passiva em ratos, reduziu a liberação de histamina em mastócitos peritoneais de ratos estimulados com IgE, a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias e o influxo de Ca^{+2} (CHOI E YAN, 2009). Extratos de plantas, ricos em derivados cumarínicos também diminuíram drasticamente os sintomas de dermatite alérgica de contato em modelos animais e inibiram respostas de desgranulação de mastócitos ativados (JOO et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que uma cumarina (3-arilcumarina), foi capaz de inibir a desgranulação de mastócitos induzida por antígeno por um ensaio utilizando como biomarcador de desgranulação a β -hexosaminidase (SANTOS, 2012).

1.8. Biodiversidade do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

As restingas são complexos ecossistemas que estão dispostos ao longo da costa brasileira e foram formadas após transgressões e regressões consecutivas do mar. Possuem grandes planícies arenosas de origem sedimentar que se ondulam por fileiras de dunas isolando lagunas, lagos, lagoas, pântanos e brejos. Apresenta flora típica, incluindo a existência de florestas, moitas e campos, formados devido a combinação de fatores físicos e químicos, como elevada temperatura, salinidade, grande deposição de salsugem e alta exposição à luminosidade (KELECOM *et al.*, 2002; COGLIATTI-CARVALHO *et al.*, 2001).

No norte do estado do Rio de Janeiro, encontra-se o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA da Restinga de Jurubatiba ou PNRJ), estando situado entre os municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã. O PARNA da Restinga de Jurubatiba foi criado em 1998 e abrange uma área total de 148,6 km², sendo 44 km de praias e 18 lagoas (COGLIATTI-CARVALHO *et al.*, 2001; MONTEZUMA e ARAUJO, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados na área do PNRJ devido a heterogeneidade vegetal existente nessa região. As inúmeras formas vegetacionais de características próprias foram criadas a partir de uma relação particular com o ambiente e por isso geram interesse aos pesquisadores (NOLASCO *et al.*, 2012).

Embora seja considerada bem preservada e tendo sofrido pouco impacto da ação humana, torna-se necessário um estudo geral sobre a restinga de Jurubatiba devido às rápidas ocupações das áreas de borda. Além disso, estudos fitoquímicos e de atividades biológicas devem ser realizados a fim de investigar as propriedades inerentes a essas espécies para validação do seu uso popular e contribuir na busca de novos produtos bioativos, de forma a evidenciar a importância da preservação desse bioma litorâneo (KELECOM *et al.*, 2002; BOSCOLO e SENNA-VALLE, 2008).

1.8.1. *Stachytarpheta schottiana* e *Stachytarpheta crassifolia*

As espécies vegetais *Stachytarpheta schottiana* e *Stachytarpheta crassifolia* pertencem à ordem Lamiales e família Verbenaceae, esta é encontrada praticamente em todos os ecossistemas terrestres e uma das cinco famílias mais importantes entre as eudicotiledôneas. Possui 1.035 espécies e 36 gêneros com distribuição pantropical, sendo algumas espécies encontradas nas regiões temperadas. Vários gêneros vêm sendo investigados devido às suas propriedades medicinais, entre os quais destaca-se o gênero *Stachytarpheta* (VICCINI *et. al*, 2008).

O gênero *Stachytarpheta* apresenta cerca de 113 espécies distribuídas na América tropical e subtropical. Algumas espécies são tradicionalmente usadas na medicina popular como purgante, vermífugo, expectorante, para ação diurética, para gargarejos e como tônico (SILVA *et al.*, 2012; SANDERS, 2001).

Investigações sobre a composição química de espécies de *Stachytarpheta* revelaram a ocorrência de glicosídeos iridoides, esteroides, flavonoides e fenilpropanoides e alguns outros compostos fenólicos e alifáticos de cadeia linear (CHOWDHURY *et al.*, 2003).

Stachytarpheta schottiana e *Stachytarpheta crassifolia* são plantas nativas encontradas na Restinga de Jurubatiba, na costa do sudeste brasileiro, e são conhecidas como gervão-da-praia. São geralmente arbustos ou subarbustos ramificados, raramente ervas, apresentando de 0,5-1,5 metros de altura, embora certos espécimes possam alcançar até 4 m. Suas flores possuem arranjo em espiral ao longo do eixo da inflorescência de forma bastante compacta, podendo atingir até 60 cm de comprimento. Apresentam corolas muito vistosas e facilmente localizadas à distância no campo, tendo normalmente coloração azul (Figuras 1 e 2)(LEAL, 2014).

Estudos realizados anteriormente, relataram o isolamento de um fenilpropanoide glicosilado no extrato bruto, frações em acetato de etila e em butanol das espécies *S. schottiana* e *S. crassifolia*, sendo considerado um dos compostos majoritários. Também foram isolados flavonoides de *S. schottiana* e *S. schottiana*. Esse fenilpropanoide apresentou-se em maior concentração na fração em acetato de etila de ambas as espécies, o que pode vir a justificar sua maior potência nos ensaios de atividade antioxidante (LEAL, 2014; DIONISIO, 2014).



Figura 1. *Stachytarpheta schottiana* no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (Fonte: Laboratório de Produtos Naturais UFRJ - Macaé – LaProN).



Figura 2. Detalhe da inflorescência de *Stachytarpheta crassifolia*. Fonte: DITTRICH, 2015.

1.8.2. *Kielmeyera membranacea*

A espécie vegetal *Kielmeyera membranacea* pertence à ordem Malpighiales e família Calophyllaceae. O gênero *Kielmeyera* é endêmico da América do Sul e apresenta aproximadamente 47 espécies, sendo a maioria encontrada exclusivamente no Brasil. É amplamente encontrado em todas as regiões do país, principalmente na região sudeste, e em diversos domínios fitogeográficos, como na floresta Amazônica, em cerrados, caatingas e Mata Atlântica (restinga) (PAES, 2014).

Algumas espécies deste gênero são popularmente conhecidas como "pau-santo", "rosa-do-campo" e "malva-do-campo". As folhas dessas plantas têm sido frequentemente utilizadas na medicina popular para tratar várias doenças tropicais, incluindo a esquistossomose, leishmaniose e malária, bem como infecções bacterianas e fúngicas (RUHFEL *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Estudos sobre a composição química do gênero *Kielmeyera* incluem o isolamento de xantonas e cumarinas, principalmente. Além disso, foram encontradas antraquinonas, triterpenos, esteroides e flavonoides (NOGUEIRA *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2009).

Algumas substâncias já foram isoladas, como 4-alquilcumarinas, 4-fenilcumarinas e 4-n-propilcumarinas, sendo estas duas últimas extraídas de folhas de *K. rugosa*. A composição química das espécies do gênero *Kielmeyera* pode variar de acordo com o habitat onde está situada, pois estudos apontam que em espécies encontradas no cerrado há um predomínio de xantonas. Enquanto, em espécies de restinga predominam 4-fenilcumarinas e 4-n-propilcumarinas (NOGUEIRA *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2009).

O extrato hidroalcoólico de caules de *Kielmeyera coriacea* é eficaz como um ansiolítico (MARTINS *et al.* 2004). O extrato hidroalcoólico das folhas de *Kielmeyera coriacea* também é eficaz como um ansiolítico, mas não possui efeito antidepressivo (AUDI *et al.*, 2002). Enquanto, a fração de diclorometano de *Kielmeyera coriacea* apresentou efeito antidepressivo em ratos, devido a presença de xantonas (BIESDORF *et al.*, 2012). Além disso, o extrato hidroalcoólico do caule de *Kielmeyera coriacea* pode aumentar a resistência da mucosa gástrica, conferindo-lhe atividade antiúlcera (GOULART *et al.*, 2005). O fracionamento cromatográfico das frações mais potentes, acetato de etila e n-butanol, da espécie *K. variabilis* permitiu a identificação de três flavonoides com atividade antioxidante (COQUEIRO *et al.*, 2013). Os extratos das espécies *K. aureovinosae* e *K. neglacta* (extrato etanólico e fração em acetato de etila) apresentaram atividade antibiótica e citotóxica, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012), e a fração em diclorometano da espécie *K. rugosa* demonstrou atividade antitumoral sem substancial toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Apesar de existirem estudos químicos sobre outras espécies, ainda não há informações sobre o perfil químico da *K. membranacea* (Figura 3). Um recente estudo verificou que os extratos etanólico, frações de acetato de etila e butanólica das folhas da espécie *Kielmeyera membranacea* apresentaram efeito vasodilatador, podendo estar associado à presença de flavonoides (PAES, 2014).

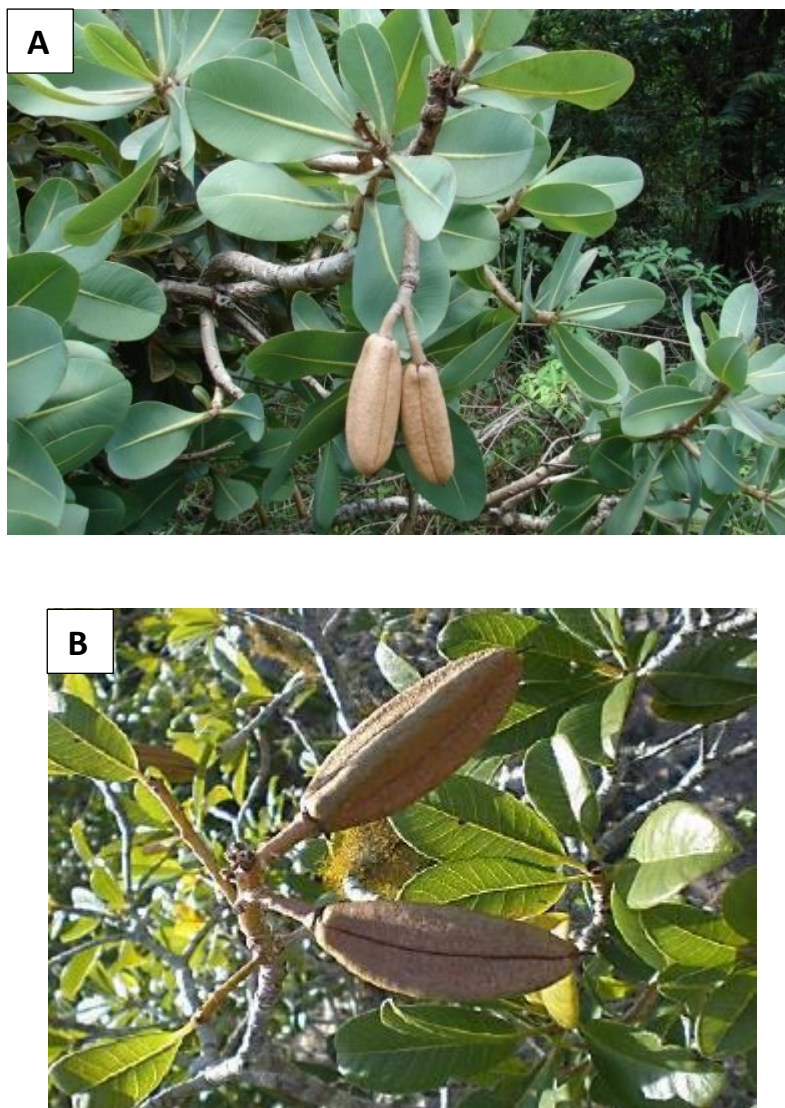


Figura 3. A) Imagem de *K. membranacea*. B) Detalhe fotográfico para os frutos de *K. membranacea*. (Fonte: Herbário IAC – SP, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças alérgicas acometem grande parte da população, interferindo no rendimento escolar de crianças e aumento do absenteísmo no trabalho. Além disso, há uma tendência no crescimento da morbidade e mortalidade por asma em vários países, incluindo o Brasil. Portanto, torna-se necessária a busca de novos candidatos a fármacos, visto que a terapia convencional pode não apresentar eficácia imediata ou ainda gerar muitos efeitos adversos.

Este estudo propõe avaliar a atividade antialérgica das espécies vegetais *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea*,

contribuindo para a literatura no fornecimento de dados sobre a atividade biológica dessas plantas medicinais e, sugerindo uma possível terapia alternativa na prevenção e/ ou tratamento de doenças alérgicas.

As espécies vegetais foram selecionadas devido à escassez de informações científicas sobre suas atividades farmacológicas e também pelo fato de apresentarem perfil químico com classes de substâncias que apontam uma potencial atividade antialérgica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa avaliar a atividade antialérgica de extratos etanólicos e frações das folhas de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* encontradas na Restinga de Jurubatiba.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se os extratos brutos possuem efeito citotóxico.
- Avaliar o efeito *ex vivo* de extratos brutos das plantas *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* sobre a inibição da desgranulação de mastócitos mesenteriais de ratos.
- Verificar se o efeito inibitório sobre a desgranulação de mastócitos mesenteriais é concentração-dependente.
- Avaliar o efeito dos extratos brutos sobre a histamina liberada *in vitro*, a partir da ativação de mastócitos peritoneais.
- Avaliar o efeito de frações do extrato bruto, de diferentes polaridades, através da quantificação de histamina liberada *in vitro* por mastócitos peritoneais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal

As espécies vegetais *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* foram coletadas no PARNA de Jurubatiba, sendo devidamente identificadas pela Prof.^a Dr.^a Tatiana Ungaretti Paleo Konno.

As folhas de *S.schottiana* e *S. crassifolia* foram coletadas no município de Quissamã (S 22.26998° - latitude e O 41.64724° - longitude para a primeira espécie; e S 22.27003° - latitude e O 41.64955° - longitude para a segunda espécie). E, as exsiccatas foram depositadas no herbário do NUPEM/UFRJ (Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé).

Enquanto as folhas da espécie *K. membranacea* foram coletadas no município de Carapebus – RJ (22°16'S/41°39'W) e uma exsicata foi deposita no Herbário do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (RFA38752).

4.2. Preparo dos extratos hidroalcoólicos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia*

As folhas das espécies vegetais coletadas foram submetidas a secagem à temperatura ambiente, com posterior pesagem e trituração. A extração foi realizada pelo método de maceração estática, utilizando etanol / água (4:1) durante sete dias, havendo renovação do solvente até o esgotamento total do material vegetal. Por fim, os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro e evaporados em rotaevaporador(50°C), resultando nos extratos brutos.

4.3. Preparo do extrato etanólico de *Kielmeyera membranacea*

As folhas de *Kielmeyera membranacea* foram submetidas a secagem em estufa com circulação de ar na temperatura de 40 °C, a fim de evitar reações de hidrólise e/ou crescimento bacteriano. Em seguida, o material foi pulverizado em liquidificador convencional, aumentando assim a área de superfície de contato para o processo de extração. Como método de extração, foi utilizada a maceração estática em etanol

absoluto, sendo o extrato posteriormente concentrado em rotaevaporador até a remoção total do solvente.

4.4. Preparo das frações de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea*

Os extratos brutos das plantas em estudo foram submetidos em seguida a um processo de partição líquido-líquido com solventes extratores em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água, como ilustra o esquema da Figura 4.

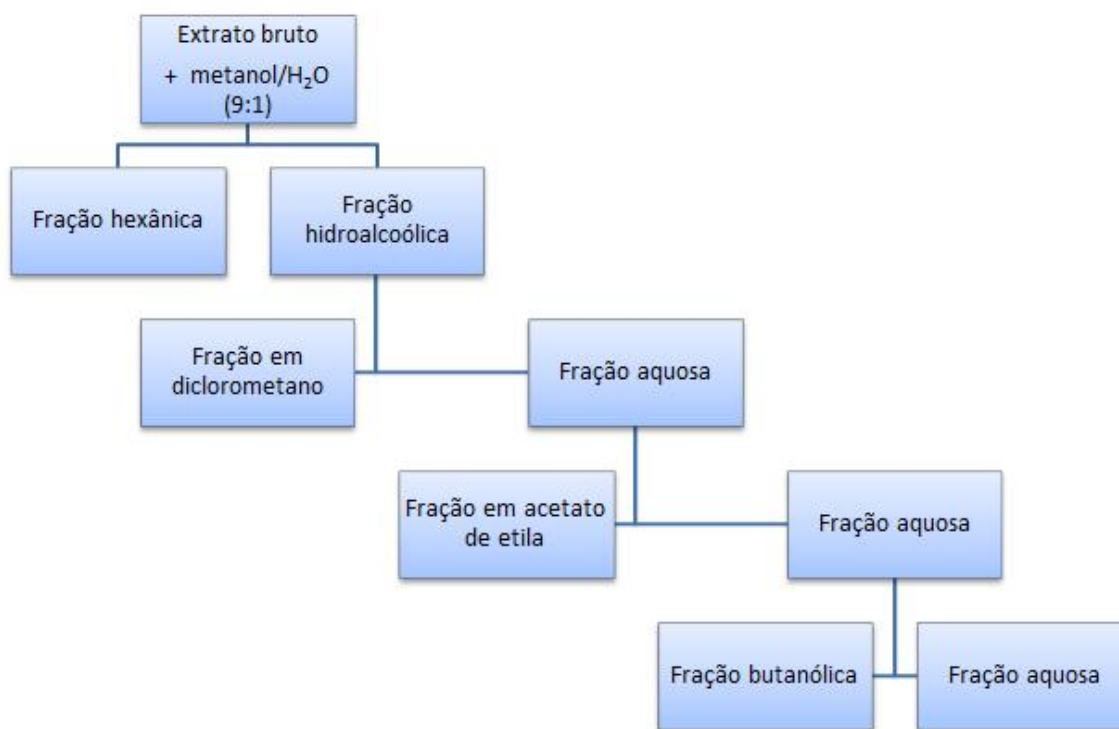


Figura 4. Etapas da partição líquido/líquido a partir do extrato bruto de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea*.

Os extratos brutos e suas frações foram preparados por alunos de iniciação científica orientados pela Prof^a Michelle Frazão Muzitano, Prof^a Ivana Correa Ramos Leal e Prof^a Denise Oliveira Guimarães do Laboratório de Produtos Naturais (LaProN), Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Texeira e gentilmente cedidos para a realização desse estudo.

Os extratos brutos e frações das espécies vegetais *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* concedidos pelo LaPron

foram ressuspensos em DMSO 0,1% (Dimetilsulfóxido) e PBS até atingir a concentração de 1mg/mL, sendo estocados a -20°C até o momento de uso.

4.5. Animais

Foram obtidos ratos Wistar, fêmeas apresentando aproximadamente 10 meses de vida do biotério da UFRJ Campus-Macaé. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura e umidade controladas, em um ciclo de 12h/12h claro/escuro, em caixas com maravalha autoclavada, sendo alimentados com ração peletizada e água filtrada. Os procedimentos com animais foram conduzidos com a aprovação da Comissão de ética para o uso dos animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob número de referência MACAE020.

4.6. Isolamento de macrófagos peritoneais

Inicialmente, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂. Em seguida, foram injetados 20 mL de meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) no peritônio, coletando-se o lavado e centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos a 10°C. O pellet formado foi ressuspenso em meio DMEM. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do corante Azul de Trypan, cujo princípio é a não incorporação do corante pelas células viáveis. As células foram ajustadas na concentração de $7,5 \times 10^6$ céls/mL, distribuiu-se 200 µL da suspensão de células por poço, em placa estéril de 96 poços.

4.7. Avaliação de citotoxicidez dos extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* em macrófagos peritoneais

Após o isolamento dos macrófagos peritoneais, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 1 hora para adesão. Em seguida, foram realizados os tratamentos com os extratos brutos das plantas nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL, separadamente, durante 24 horas, a 37°C e 5% CO₂. Como grupos

controles foram utilizados o grupo não tratado (apenas DMEM) e o grupo tratado com Triton a 10% (controle positivo de lise máxima). Após esse período de tempo, o sobrenadante da cultura de células foi separado para a dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). O experimento foi realizado duas vezes em duplicata.

4.8. Dosagem de LDH

A dosagem de LDH foi realizada pelo uso de um kit colorimétrico (Doles), adaptado para dosagem em sobrenadante de células. Resumidamente, em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 µL das amostras. Em seguida, adicionou-se 100 µL de uma solução contendo alúmen férrico e substrato, incubando-se a 37°C por 2 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de uma solução contendo NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FMS (fenasina metasulfato) a 37°C por 5 minutos. A dosagem colorimétrica foi realizada através da leitura em comprimento de onda de 510 nm.

O resultado foi expresso em valores percentuais relativos da liberação de LDH, considerando-se o controle positivo como sendo o valor de lise máxima, e o controle negativo, representou a lise mínima. Para o cálculo de percentual relativo de liberação de LDH, foi utilizada a equação:

$$\text{Percentual relativo de liberação de LDH} = \frac{(\text{D.O. amostra} - \text{D.O. Controle negativo}) * 100}{(\text{D.O. Triton} - \text{D.O. Controle negativo})}$$

4.9. Ensaio de desgranulação de mastócitos mesenteriais *ex vivo*

O ensaio foi realizado utilizando membranas do mesentério de ratos Wistar. Inicialmente, as membranas contendo mastócitos foram isoladas e sensibilizadas com anticorpo IgE anti-DNP (0,001 mg/mL), exceto o grupo controle negativo (recebeu apenas solução tampão salina, PBS), sendo incubadas a 37 C°, durante 1 hora. Para avaliar a atividade concentração-dependente os extratos foram diluídos em três concentrações distintas (0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL), utilizando PBS como solvente. Para o tratamento, foram adicionados 500 µL dos extratos brutos de *S. schottiana*, *S. crassifolia* e *K. membranacea* nas concentrações

mencionadas para os grupos teste a 37 °C durante 30 minutos. Como controle de tratamento com um produto natural com atividade inibitória sobre a desgranulação (FERREIRA, 2011), foi realizado o tratamento com o flavonoide quercetina a 0,1 mg/mL. O grupo controle positivo para desgranulação foi tratado apenas com PBS. Em seguida, todos os grupos foram desafiados com 500 µL de antígeno DNP a 0,0001 mg/mL, sendo incubados à 37°C por 30 minutos. Por fim, os mastócitos mesenteriais foram corados com Azul de Toluidina para a contagem das células intactas e desgranuladas em microscópio óptico invertido no aumento de 40 x.

4.10. Isolamento de mastócitos peritoneais

Primeiramente, os animais submetidos a eutanásia em câmara de CO₂. Após, foram injetados 20 mL de PBS/BSA 0,1% gelado (4°C) no peritônio dos ratos e aspirou-se o lavado peritoneal com o auxílio de uma seringa.

Posteriormente, o conteúdo da seringa foi transferido para um tubo de ensaio, centrifugado a 150 g por 5 minutos a uma temperatura de 25°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensão em 1 mL de PBS contendo BSA.

Em outro tubo de ensaio, preparou-se 4 mL de percoll 72% e 1 mL da suspensão de células foi adicionada lentamente, submetendo-se a centrifugação a 150 g, durante 30 minutos à 25 °C. Em seguida, transferiu-se a camada de mastócitos obtida para outro tubo de ensaio, sendo adicionado 1 mL de meio Hanks rico em cálcio e magnésio. As células foram contadas com o uso do corante Azul de toluidina e a concentração ajustada para 3×10^5 /mL, distribuindo-se 400 µL de células por poço, em placa estéril de 24 poços.

4.11. Indução da liberação de histamina *in vitro*

Após o isolamento de mastócitos peritoneais, as células foram estimuladas com anticorpo IgE anti-DNP (0,5 µg/mL) e incubadas a 37 °C / 5% CO₂ durante 12 h, exceto o grupo controle negativo de desgranulação (tratado apenas com meio Hanks), grupo tratado com Composto 48/80 (indutor de desgranulação via indução

do aumento de cálcio intracelular) e o grupo ácido perclórico (liberação total de histamina intracelular).

Após a sensibilização com anticorpo, as células foram tratadas com os extratos brutos a 0,5 mg/mL, suas frações a 0,1 mg/mL e com o flavonoide quercetina a 0,1 mg/mL. Incubou-se por 1 h a 37 °C / 5% CO₂.

A desgranulação e consequente liberação de histamina foi induzida com a adição do antígeno DNP (0,05 µg/mL). Nesta etapa, foram adicionados o Composto 48/80 a 0,5 µg/mL e ácido perclórico 0,4 N para a determinação da histamina. Incubou-se por 1 h a 37 °C / 5% CO₂.

Centrifugou-se a placa a 150 g por 10 minutos e coletou-se o sobrenadante obtido para a quantificação de histamina pela técnica de ELISA. O experimento foi realizado três vezes em duplicata.

4.12. Quantificação de histamina liberada *in vitro*, a partir da ativação de mastócitos peritoneais

Para a dosagem da histamina, utilizou-se o kit de ELISA competitivo (Elabscience®). Resumidamente, foram feitas diluições do padrão de histamina nas seguintes concentrações: 100 ng/mL; 50 ng/mL; 25 ng/mL; 12,5 ng/mL; 6,25 ng/mL; 3,13 ng/mL; 1,56 ng/mL; 0 ng/mL. Em duplicata, foram adicionados em placa de 96 poços 50 µL das diluições do padrão de histamina nas concentrações mencionadas e 50 µL de sobrenadante das amostras obtidas no teste de indução da liberação de histamina *in vitro*. Imediatamente, foi adicionado o anticorpo de detecção biotinilado (50 µL/ poço) em todos os poços e incubou-se por 45 minutos a 37°C em estufa. Os poços foram lavados 3 x com 200 µL da solução de lavagem. Após, adicionou-se 100 µL de conjugado HRP por poço e incubou-se por 30 minutos a 37°C em estufa. Repetiu-se o procedimento de lavagem como mencionado anteriormente. Foram adicionados 90 µL de substrato TMB (tetrametil benzidina) em cada poço, a placa foi vedada para proteção contra reação da luz e incubou-se por mais 15 minutos a 37°C em estufa. Por fim, adicionou-se 50 µL de HCl (ácido clorídrico) e realizou-se a leitura da densidade óptica da histamina em leitor de ELISA a 450 nm.

4.13. Análise estatística

Os resultados foram relatados como média \pm desvio padrão e analisados utilizando o software BioEstat® versão 5.0, através do teste ANOVA seguido por Tukey. Um valor de $p \leq 0,01$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de citotoxicidez

No ensaio de citotoxicidez *in vitro*, os materiais avaliados têm contato direto com culturas de células a fim de analisar o efeito direto sobre elas. Esta técnica possui vantagens como facilidade, rapidez de execução e baixo custo (MARTINS *et. al*, 2009).

A coleta de macrófagos peritoneais em roedores é amplamente difundida devido à facilidade da técnica e obtenção de altas concentrações celulares. (AMARAL, 2004). A citotoxicidez foi investigada através do teste de liberação da enzima citoplasmática Lactato Desidrogenase (LDH), encontrada no citoplasma das células e sendo liberada para o meio extracelular frente a lesões na membrana plasmática das células. Dessa forma, a presença de LDH em um fluido ou meio extracelular indica a ocorrência de morte celular seguida de rompimento de sua membrana, também denominado necrose (NUNES *et. al*, 2011; PEDROSA, 2013).

Conforme demonstrado na figura 5, pode-se observar que, os macrófagos tratados com 10% de Triton X-100 apresentaram $99,94 \pm 23,30\%$ de liberação relativa de LDH. Enquanto o extrato bruto de *Stachytarpheta schottiana* apresentou $6,35 \pm 26,95\%$ de liberação de LDH na concentração de 0,1 mg/mL e $- 4,28 \pm 6,20 \%$ na concentração de 0,5 mg/mL. O extrato bruto de *Stachytarpheta crassifolia* apresentou $-15,08 \pm 1,31 \%$ de liberação de LDH na concentração de 0,1 mg/mL, enquanto a concentração de 0,5 mg/mL teve $25,15 \pm 0,94\%$.

Já o extrato bruto de *Kielmeyera membranacea* apresentou $12,55 \pm 7,23\%$ de liberação relativa de LDH na concentração de 0,1 mg/mL e $- 8,26 \pm 2,04 \%$ na concentração de 0,5 mg/mL (Figura 5). Os valores negativos são considerados como

não detectáveis, pois apresentaram liberação de LDH inferior ao grupo controle negativo.

Sendo assim, os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* não apresentaram efeitos citotóxicos sobre os macrófagos peritoneais nas concentrações testadas, quando comparados ao grupo controle positivo para lise celular (triton 10%), sendo os valores significativamente estatísticos.

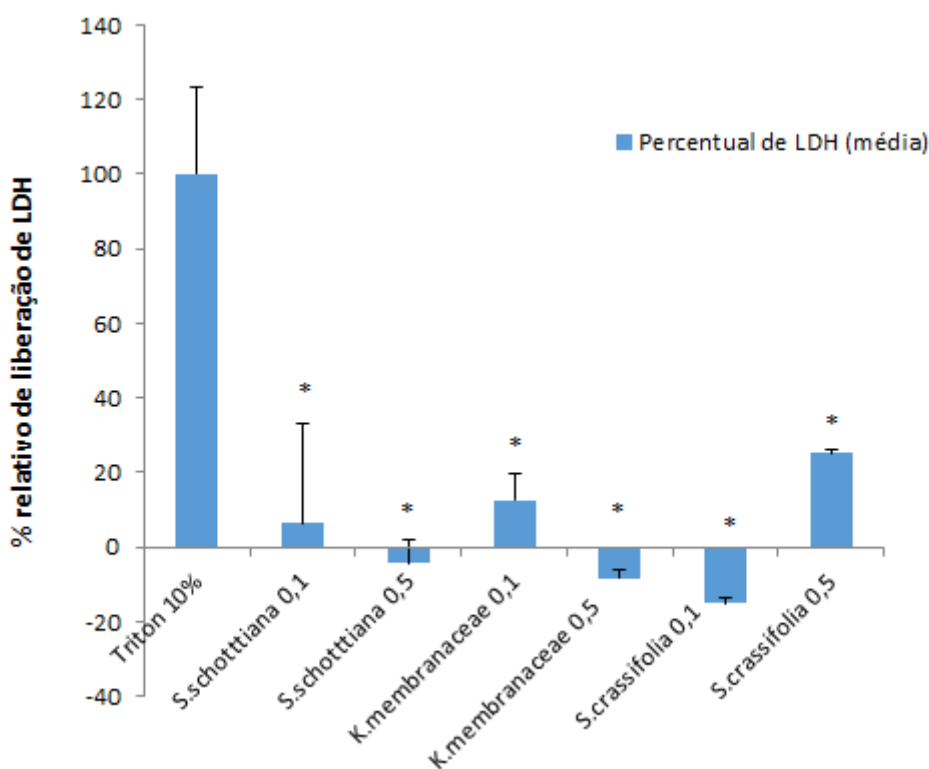


Figura 5. Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea*. Macrófagos peritoneais foram plaqueados e tratados com extrato bruto (0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL), o grupo controle negativo não recebeu tratamento e ao grupo controle positivo foi adicionado 10% de Triton X-100. As células foram incubadas durante 24h e a LDH liberada no fluido extracelular foi mensurada por método colorimétrico em ELISA. Média \pm desvio padrão (n=2) e *p<0,01 em relação ao controle Triton 10%.

5.2. Ensaio de desgranulação de mastócitos mesenteriais *ex vivo*

Sabendo-se que a desgranulação de mastócitos é um dos eventos responsáveis pela iniciação da inflamação alérgica, foi investigado se os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* seriam capazes de inibir a desgranulação destas células. Para isso, foi utilizado um

modelo *in vitro* de desgranulação de mastócitos em membranas mesenteriais de ratos, por ser uma membrana rica nestas células. Com relação aos grupos controle, utilizou-se a quercetina como controle positivo de inibição de desgranulação. O grupo IgE anti-DNP foi utilizado como controle positivo de desgranulação, foi sensibilizado com anticorpo IgE anti-DNP, não tratado, sendo adicionado apenas PBS e foi desafiado com antígeno DNP. Já o controle negativo (grupo PBS), não foi sensibilizado com anticorpo IgE anti-DNP, não recebeu tratamento, sendo apenas desafiado com antígeno DNP.

Conforme representado na figura 6, o controle positivo apresentou desgranulação igual a 71 %, enquanto o tratamento com o extrato bruto da planta *Stachytarpheta schottiana* apresentou um percentual de 26±4,24%, 14±4,24% e 5±4,24% de mastócitos desgranulados, nas concentrações de 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente, sendo a última concentração testada a que apresentou maior efeito inibitório. Todos os tratamentos foram capazes de inibir significativamente a desgranulação de mastócitos *ex vivo*. Além disso, observou-se que esta atividade inibitória foi concentração-dependente.

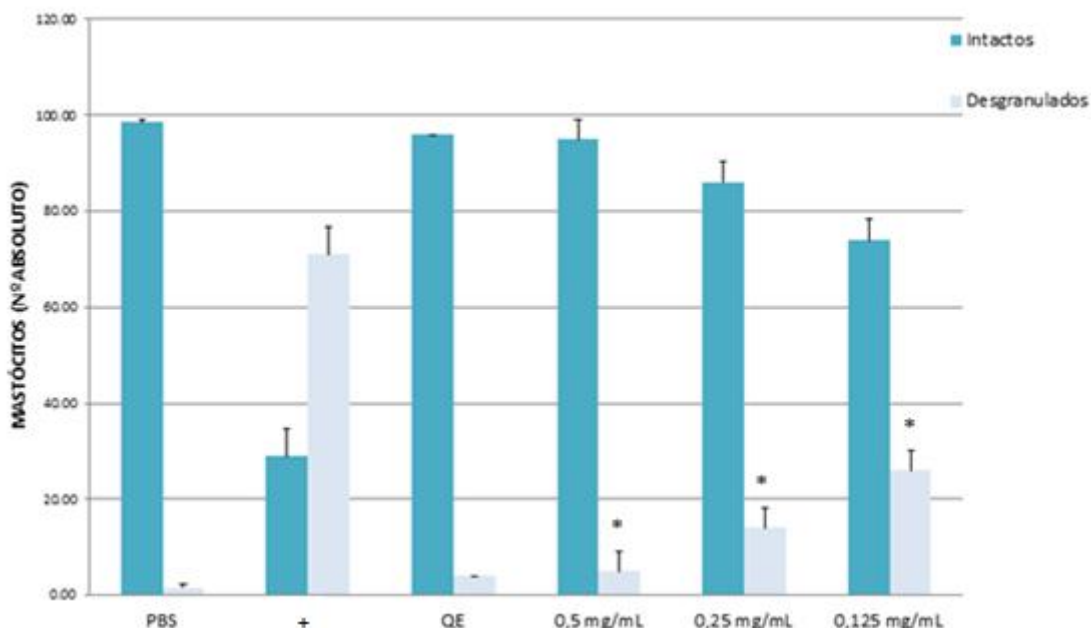


Figura 6. Atividade concentração-dependente de *Stachytarpheta schottiana*. Mastócitos do mesentério de ratos Wistar foram sensibilizados com IgE a-DNP 0,001 mg/mL por 1h a 36°C. As células foram tratadas com extrato bruto de *S. schottiana*, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL (exceto os grupos: PBS, controle positivo de desgranulação e quercetina) por 30 minutos a 36 °C. Em seguida, as células foram ativadas com DNP 0,0001 mg/mL por 30 minutos a 36°C. A contagem de células foi realizada em microscópio óptico após coloração com Azul de Toluidina. Média ± desvio padrão (n=2) e *p<0,01 em relação ao controle positivo de desgranulação.

Foi observado que o extrato bruto de *Stachytarpheta crassifolia* nas três concentrações utilizadas foi capaz de inibir significativamente a desgranulação de mastócitos *ex vivo*, conforme representado na figura 7. Isto, porque, o controle positivo apresentou desgranulação igual a 87 %, enquanto o tratamento com o extrato bruto desta planta na concentração de 0,125 mg/mL revelou um percentual de desgranulação de $38 \pm 2,82\%$, $29 \pm 4,24\%$ na concentração de 0,25 mg/mL e $23 \pm 1,41\%$ na concentração de 0,5 mg/mL, sendo a última concentração a que apresentou maior efeito inibitório. A atividade apresentada foi concentração-dependente.

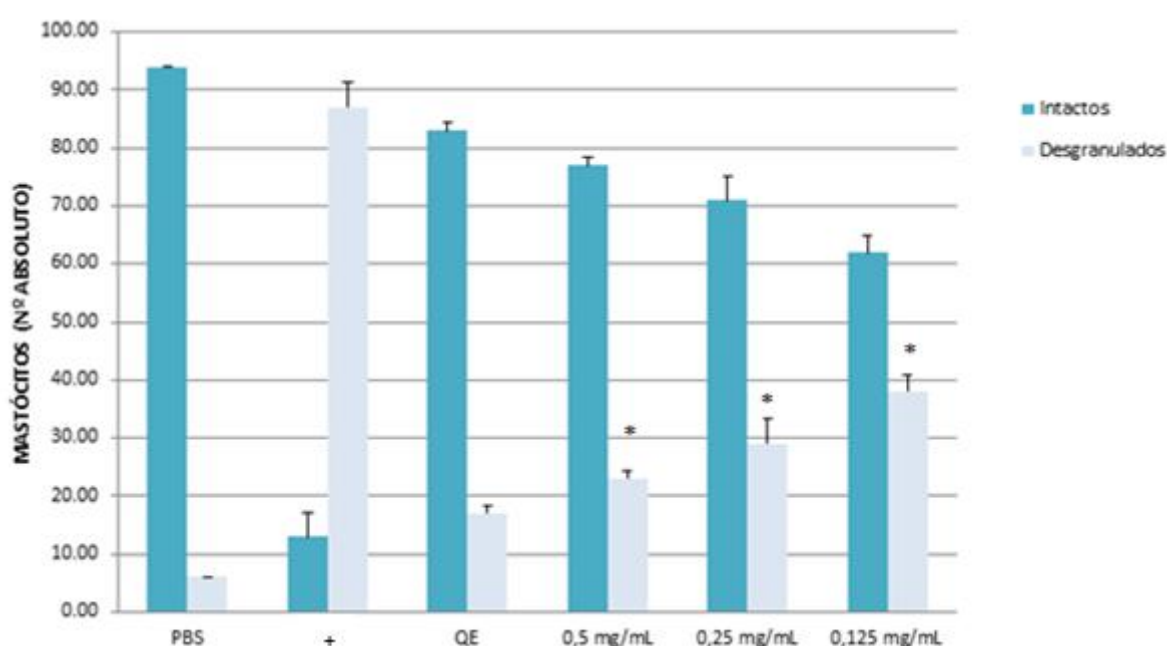


Figura 7. Atividade concentração-dependente de *Stachytarpheta crassifolia*. Mastócitos do mesentério de ratos Wistar foram sensibilizados com IgE a-DNP 0,001 mg/mL por 1h a 36°C. As células foram tratadas com extrato bruto de *S. crassifolia*, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL (exceto os grupos: PBS, controle positivo de desgranulação e quercetina) por 30 minutos a 36 °C. Em seguida, as células foram ativadas com DNP 0,0001 mg/mL por 30 minutos a 36°C. A contagem de células foi realizada em microscópio óptico após coloração com Azul de Toluidina. Média \pm desvio padrão (n=2) e *p<0,01 em relação ao controle positivo de desgranulação.

De acordo com a figura 8, também foi obtida atividade inibitória da desgranulação de mastócitos *ex vivo* tratados com o extrato bruto de *Kielmeyera membranacea*. O grupo controle positivo apresentou 98 % de mastócitos desgranulados, enquanto o extrato bruto nas concentrações de 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL, apresentou $35 \pm 1,41\%$, $33 \pm 1,41\%$ e $23 \pm 1,41\%$ de mastócitos desgranulados, respectivamente. A atividade inibitória foi concentração-dependente.

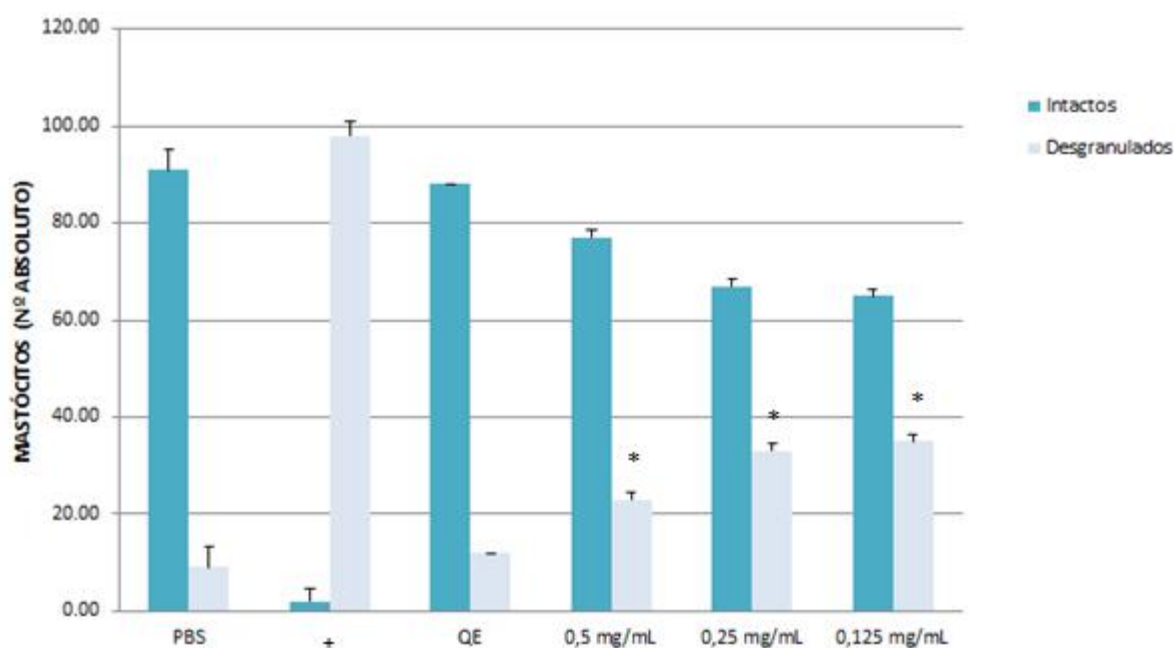


Figura 8. Atividade concentração-dependente de *Kielmeyera membranacea*. Mastócitos do mesentério de ratos Wistar foram sensibilizados com IgE α -DNP 0,001 mg/mL por 1h a 36°C. As células foram tratadas com extrato bruto de *K.membranacea*, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL (exceto os grupos: PBS, controle positivo de desgranulação e quercetina) por 30 minutos a 36 °C. Em seguida, as células foram ativadas com DNP 0,0001 mg/mL por 30 minutos a 36°C. A contagem de células foi realizada em microscópio óptico após coloração com Azul de Toluidina. Média \pm desvio padrão (n=2) e *p<0,01 em relação ao controle positivo de desgranulação.

5.3. Quantificação de histamina liberada *in vitro*

A ativação dos mastócitos pode ocorrer por via imunológica, sendo mediada pelo anticorpo IgE, ou, de maneira independente, para a qual o composto 48/80 é usado experimentalmente como estímulo farmacológico para mastócitos. Este agente contém uma região catiônica adjacente a uma fração hidrofóbica, que atuam ativando as proteínas G e culmina na secreção de histamina (ABBAS *et al.*, 2011).

De acordo com os dados demonstrados na figura 9, após o tratamento dos mastócitos com os extratos vegetais e sua posterior estimulação imunológica, observou-se que o grupo controle positivo IgE α DNP apresentou liberação de histamina igual a $82,68 \pm 0,41$ ng/mL. Os grupos composto 48/80 e grupo ácido perclórico apresentaram $81,21 \pm 0,27$ ng/mL e $96,80 \pm 10,67$ ng/mL, respectivamente. Os mastócitos tratados com os extratos de *S. schottiana*, *S. crassifolia* e *K. membranacea* apresentaram $13,56 \pm 2,21$ ng/mL, $23,07 \pm 2,63$ ng/mL e $38,76 \pm 4,68$ ng/mL, respectivamente. Sendo assim, as espécies vegetais foram capazes de inibir a liberação de histamina de forma significativa quando comparadas ao grupo

controle positivo IgE α DNP.

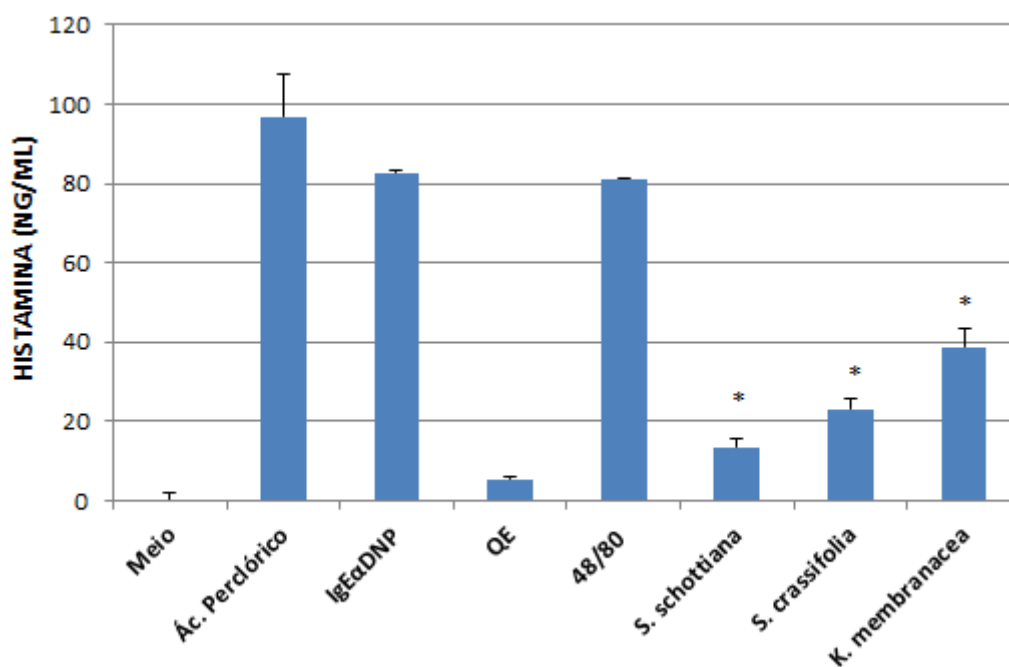


Figura 9. Avaliação dos extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyramembranacea* sobre a liberação de histamina *in vitro*. Mastócitos peritoneais de ratos Wistar foram inicialmente sensibilizados com IgE anti-DNP (0,5 μ g/mL), após foram tratados com: a) extratos vegetais brutos (0,5 mg/mL), b) composto 48/80 (0,5 μ g/mL), c) quercetina (0,1 mg/mL), d) ácido perclórico (0,4 N). A desgranulação foi induzida com a adição do antígeno DNP (0,05 μ g/mL). O sobrenadante obtido foi coletado para a quantificação de histamina por método colorimétrico em ELISA. Média \pm desvio padrão (n=2) e *p<0,01 em relação ao grupo controle positivo de liberação de histamina IgE α DNP.

Em um estudo realizado anteriormente, foi avaliado o teor de fenóis totais presentes nas espécies *S. schottiana* e *S. crassifolia*, sendo igual a 39,75 mEqAG% e 18,69 mEqAG%, respectivamente (LEAL, 2014). Este dado pode estar relacionado à redução da liberação de histamina *in vitro* observada aqui, após o tratamento com os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana* e *Stachytarpheta crassifolia*, onde a maior presença dessas substâncias parece estar associada a um melhor efeito.

Há várias metodologias para o preparo de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos mais adequados para a análise químico-farmacológica é o preparo de um extrato hidroalcoólico. Este, é semelhante às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas (FILHO e YUNES, 1998).

Como os extratos brutos apresentaram efeitos biológicos de interesse, deu-se sequência ao estudo utilizando suas frações químicas, obtidas conforme descrito no item 4.4 da metodologia, através de um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. Dessa forma, foram testadas frações de acetato de etila e butanol de *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea*. Não haviam frações de *Stachytarpheta schottiana* disponíveis para o ensaio.

Segundo os dados demonstrados na figura 10, o controle positivo (grupo IgE α DNP) apresentou liberação de histamina igual a $72,68 \pm 0,69$ ng/mL, enquanto o grupo composto 48/80 apresentou $74,54 \pm 0,83$ ng/mL e o grupo ácido perclórico $90,62 \pm 1,38\%$ de liberação de histamina. Com relação às frações químicas butanólica e acetato de etila de *Stachytarpheta crassifolia* observou-se as concentrações de $12,19 \pm 1,10$ ng/mL e $8,17 \pm 0,97$ ng/mL de histamina liberada pelos mastócitos, respectivamente. Enquanto para *Kielmeyera membranacea* foram detectadas as concentrações de $22,49 \pm 0,69$ ng/mL e $26,11 \pm 0,83$ ng/mL, após o tratamento com as frações butanólica e acetato de etila, respectivamente. Sendo assim, ambas as frações das espécies vegetais aqui estudadas foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,01$) a liberação de histamina, quando comparadas ao grupo controle positivo (IgE α -DNP).

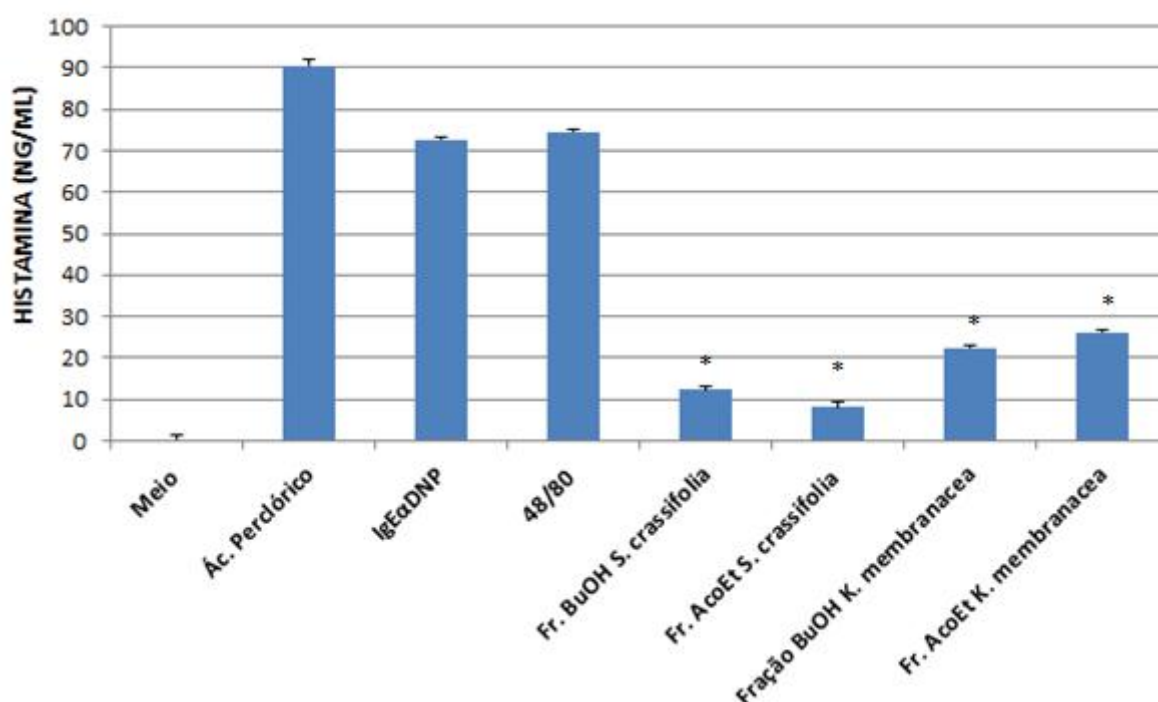


Figura 10. Avaliação do efeito das frações de *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* sobre a liberação de histamina *in vitro*. Mastócitos peritoneais de ratos Wistar foram sensibilizados com anticorpo IgE anti-DNP (0,5 µg/mL), posteriormente foram tratados com: a) frações de acetato de etila (Fr.AcoEt) e butanólica (Fr.BuOH) (0,1 mg/mL), b) composto 48/80 (0,5 µg/mL), c) ácido perclórico (0,4 N). E foi feita a indução da desgranulação com a adição do antígeno DNP (0,05 µg/mL). O sobrenadante obtido foi coletado para a quantificação de histamina por método colorimétrico em ELISA. Média ± desvio padrão (n=2) e *p<0,01 em relação ao grupo controle positivo de liberação de histamina IgE αDNP.

Apesar do modelo *in vitro* não considerar os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, possuem diversas vantagens que contribuem na pesquisa de novos ativos de origem natural, tais como controle do pH, temperatura, tensão de CO₂, condições que podem ser mantidas relativamente constantes. Trata-se de um método com menores custos econômicos que os testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais em experimentos. Além disso, é utilizada uma quantidade reduzida de material vegetal e contribui para o estudo através do fracionamento bioguiado de determinado extrato, facilitando a seleção das frações e sub-frações mais ativas para posteriormente serem estudadas em modelos *in vivo* (BOGO, 2012; ARAUJO, 2013).

Os resultados obtidos após o tratamento com *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* indicam que substâncias presentes nas frações butanólica e acetato de etila podem ser responsáveis pelo efeito de redução da liberação de histamina *in vitro*.

As substâncias preferencialmente extraídas pelo solvente butanol são flavonoides glicosilados, saponinas e taninos. Enquanto o solvente acetato de etila extrai, preferencialmente, flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e cumarinas simples (FILHO & YUNES, 1998; SIMÕES *et al.*, 2010).

Em um estudo fitoquímico realizado anteriormente, o extrato bruto de *S. schottiana* revelou a presença de 5 picos majoritários entre os tempos de retenção de 20 e 25 minutos, onde dois desses picos sugerem a presença de fenilpropanoide glicosilado e os outros três picos majoritários sugerem a presença de flavonoides. Concluiu-se que o fenilpropanoide glicosilado trata-se de um verbascosídeo, presente também nas frações de acetato de etila e butanólica de *Stachytarpheta schottiana*, contudo apresenta-se em maior concentração na fração em acetato de etila (LEAL, 2014).

Em outro estudo, comparou-se o perfil cromatográfico do extrato bruto de *S. crassifolia*, fração acetato de etila e butanólica. Foi observado que todas apresentaram picos majoritários referentes aos flavonoides e fenilpropanoides. Além disso, observou-se um dos picos majoritários em comum, sugerindo a presença de um verbascosídeo. Como observado por LEAL, para a espécie *Stachytarpheta schottiana*, a fração acetato de etila de *Stachytarpheta crassifolia* também possui maior concentração de verbascosídeo quando comparada ao extrato bruto e fração butanólica (DIONISIO, 2014).

Resultados obtidos com diferentes extratos vegetais sobre a liberação de histamina induzida por agentes secretagogos como o composto 48/80 em modelo *in vitro*, permitiu identificar que extratos de folhas e caules produziram os melhores efeitos inibitórios sobre a liberação induzida de histamina. As folhas destas espécies possuem em sua constituição uma série de compostos secundários, incluindo principalmente a presença de flavonoides (FERREIRA, 2011).

Adicionalmente, estudos evidenciaram potente efeito inibitório de extratos de plantas sobre a inibição da desgranulação mastocitária (SINGHA *et al.*, 2012), redução na liberação de histamina *in vitro* (IKAWATI *et al.*, 2001) e para ambos os efeitos (ANDHARE *et al.*, 2012; TAUR e PATIL, 2011). Estes extratos apresentaram flavonoides em sua composição química, sendo apontados como possíveis agentes antialérgicos.

Outros estudos revelaram potente efeito inibitório da fração acetato de etila de plantas medicinais sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80 em modelo *in vitro*. A análise fitoquímica permitiu a detecção de flavonoides como sendo as substâncias responsáveis por esse efeito (OLIVEIRA, 2013; ARAUJO, 2013).

Esses dados demonstram que os flavonoides constituem um amplo grupo de compostos com diferentes mecanismos de ação associados às atividades anti-inflamatória e antialérgica. Com base nessas informações, podemos sugerir que a presença destas substâncias nos extratos estudados, pode estar relacionada aos efeitos inibidores da desgranulação de mastócitos e inibição da liberação de histamina observados em nossos resultados.

Devido ao elevado teor de verbascosídeo nas amostras de *S. schottiana* e *S. crassifolia*, este composto pode ser utilizado com um marcador fitoquímico para estas espécies. A presença do fenilpropanoide verbascosídeo já foi relatada no gênero e também é considerado um marcador fitoquímico da família Verbenaceae (LEAL, 2014; DIONISIO, 2014).

Relatos da literatura apontam que o verbascosídeo apresentou atividade anti-inflamatória *in vitro*, onde foi capaz de reduzir significativamente de forma dose dependente, a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias. Além disso, foi capaz de promover a melhora e reparação de inflamações na pele, devido a capacidade de sequestrar ERO (atividade antioxidante), de quelar ferro, entre outros mecanismos (OLIVEIRA, 2014). Em estudo *in vivo*, o verbascosídeo demonstrou atividade antiinflamatória através da inibição de histamina e bradicinina, ou ainda, através do sequestro de óxido nítrico (SCHAPOVAL et al., 1998; XIONG et al., 2000). Também é capaz de inibir enzimas da cascata do ácido araquidônico, interferindo na atividade da tromboxano sintase; reduz a geração de óxido nítrico e de TNF- α , e apresenta seletividade para inibição de COX-2 (DIAZ et al., 2004).

FERREIRA (2011) descreveu a atividade antialérgica de derivados fenilpropanoides de *Ipomoea chiliantha*, como resultado foram capazes de inibir a desgranulação mastocitária, A atividade anti-alérgica foi avaliada por meio da enzima β - hexosaminidase. Esta enzima é liberada dos mastócitos em situação alérgica.

Os efeitos de inibição da desgranulação de mastócitos e redução da liberação de histamina observados após o tratamento com os extratos brutos ou frações químicas acetato de etila e butanólica de *Stachytarpheta schottiana* e *Stachytarpheta*

crassifolia possivelmente estão relacionados à presença de flavonoides e do fenilpropanoide verbascosídeo, considerando que esta substância se encontra em maior concentração na fração acetato de etila de ambas as espécies. Estudos posteriores são necessários para avaliação desta possível atividade antialérgica.

Com relação à *Kielmeyera membranacea*, a análise do perfil químico do extrato bruto e frações ainda não foi finalizada. Estudos apontam que a composição química das espécies do gênero *Kielmeyera* pode variar de acordo com o habitat onde está localizada. Em espécies encontradas no cerrado há um predomínio de xantonas. Já, em espécies de restinga predominam 4-fenilcumarinas e 4-n-propilcumarinas. (NOGUEIRA *et al.*, 2009; SOBRAL *et al.*, 2009). O fracionamento cromatográfico das frações mais potentes, acetato de etila e n-butanol, da espécie *Kielmeyera variabilis* permitiu a identificação de três flavonoides com atividade antioxidante (COQUEIRO *et al.*, 2013).

Durante a análise de extratos de espécies vegetais, observou-se efeito inibitório sobre a liberação de histamina induzida por composto 48/80 em modelo *in vitro*. O efeito pode ser atribuído aos flavonoides, porém há a possibilidade de ação dos derivados cumarínicos (OLIVEIRA, 2013). CHANDRASHEKHAR, constatou através de experimentos que extrato de planta contendo flavonoides e cumarinas foi capaz de inibir a desgranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 e diminuir a liberação de histamina *in vitro*.

As cumarinas ocorrem naturalmente como metabólitos secundários de plantas, fungos e bactérias. Constituem uma classe importante de agentes farmacológicos detentora de uma ampla variedade de atividade fisiológicas, incluindo anti-câncer (RIVEIRO *et al.*, 2010), anti-coagulante (HOULT e PAYÁ, 1996), anti-inflamatória (KONTOGIORGIS e HADJIPAVLOU-LITINA, 2003), anti-microbiana (WAFFO *et al.*, 2000) e anti-oxidante (KONTOGIORGIS e HADJIPAVLOU-LITINA, 2003).

De um modo geral, os efeitos de inibição da desgranulação de mastócitos e redução na liberação de histamina observados para o extratos bruto, frações de acetato de etila e butanólica de *Kielmeyera membranacea* possivelmente estão relacionados à presença de flavonoides e derivados cumarínicos, tendo em vista que estes componentes foram relatados em estudos químicos sobre espécies do mesmo gênero e são frequentemente associados aos efeitos observados.

Com base nos resultados preliminares aqui apresentados, é possível sugerir que os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e

Kielmeyera membranacea possuem atividade antialérgica, sendo necessário dar continuidade aos experimentos para melhor avaliar a atividade biológica em modelos *in vivo* de inflamação alérgica. Além disso, foi visto que o tratamento com as frações químicas acetato de etila e butanólica das espécies *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* inibiu significativamente a liberação de histamina *in vitro*, sendo necessário estudos posteriores para determinar o mecanismo de ação dos extratos e frações, bem como de substâncias bioativas isoladas, responsáveis pelos efeitos antialérgicos observados.

6. CONCLUSÃO

- Os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* não apresentaram citotoxicidade para macrófagos peritoneais nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL, sendo os valores significativamente estatísticos.
- Os extratos brutos de *Stachytarpheta schottiana*, *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* inibiram significativamente a desgranulação de mastócitos *ex vivo* de forma concentração-dependente, em modelo de desgranulação de mastócitos do mesentério.
- Os extratos brutos das três espécies vegetais em estudo foram capazes de inibir significativamente a liberação de histamina *in vitro*.
- As frações butanólica e acetato de etila de *Stachytarpheta crassifolia* e *Kielmeyera membranacea* foram capazes de inibir significativamente a liberação de histamina *in vitro*.
- Os efeitos antialérgicos possivelmente encontrados após tratamento com *Stachytarpheta schottiana* e *Stachytarpheta crassifolia* podem estar relacionados à presença de flavonoides e verbascosídeo, composto majoritário nas duas espécies e obtido em maior concentração na fração acetato de etila.

- As prováveis substâncias ativas responsáveis pelos efeitos antialérgicos possivelmente encontrados em *Kielmeyera membranacea* são flavonoides e cumarinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Respostas Imunes Dependentes de IgE e Doenças Alérgicas. In: ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap. 19. p. 425-436. Tradução de Tatiana Ferreira Robaina et. al.

ADAMS, R.J.; FUHLBRIGCE, A.L. ; FINKELSTEIN, J.A.; WEISS, S.T. Intranasal steroids and the risk of emergency department visits for asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 109, p. 636 – 42, 2002.

ALI H. Regulation of human mast cell and basophil function by anaphylatoxins C3a and C5a. **Immunol Lett** v. 128, n. 1, p.36-45, jan. 2010.

AMARAL, Kali Fatima. **Análise da citotoxicidade do EDTA e do ácido cítrico aplicados em cultura de macrófagos peritoneais residentes**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AMIN, Kawa. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**. v. 106, p. 9-14. 2012.

ANDHARE, Rohan N.; K.RAUT, Mayuresh; NAIK, Suresh R.. Evaluation of antiallergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Sanseveiria trifasciata* leaves (EEST) in rodents. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 142, p.627-633, 2012.

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

AUDI, E.A.; OTOBONE; MARTINS, F., J.V.C.; CORTEZ, D.A.G. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system. **Fitoterapia**. v. 73, p.517-519. 2002.

BARDANA, EJ Jr. Occupational asthma and allergies. **J Allergy Clin Immunol**, p. 530-539. fev. 2003.

BASSO, Débora Fernanda; CORSO, Arlete Catarina Tittoni; KUPEK, Emil. Associação ente obesidade e asma. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, v. 16, n. 4-6, p.221-231, jul./dez. 2007.

BELLIK, Yuva et al. Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update. **Molecules**. p. 322-353. 2013.

BEUTHER D, SUTHERLAND E. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 175, p. 661–6. 2007.

BIESDORF, C.; CORTEZ, D.A.G.; AUDI, E.A.. Assessment of anxiolytic and panicolytic effects of dichloromethane fraction from stems of *Kielmeyera coriacea*. **Phytomedicine**. v. 19, p.374-377. 2012.

BOGO, Danielle. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de liquens**. 2012. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

BOSCOLO, O.H. e SENNA-VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **IHERINGIA, série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.

CALVERT J, BURNEY P. Effect of bodymass on exercise-induced broncho-spasm and atopy in African children. **J Allergy Clin Immunol**. v. 116, p. 773–9. 2005.

CARVALHO A. P., MIRANDA O. P., JULIÃO L. S., OLIVEIRA G. M. A. M., GOMES M. Plant extract obtained from *Kielmeyera aureovinosa* which has antibiotic activity, isolated chemical compound, compositions comprising same, uses thereof and methods for preventing and treating bacterial infections. Organização Mundial da Propriedade Intelectual. n.17, p. 4622. 2012.

CASAGRANDE, Rejane R D et al. Prevalência de asma e fatores de risco em escolares da cidade de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 3, p.517-523, 2008.

CHANDRASHEKHAR, V.M., et al. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 137, p.336-340, 2011.

CHO, J.H.; LEE, J. Y.; SIM S.S.; WHANG, W.K.; KIM, C. J. **Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs**. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 23, p. 190–199, 2010.

CHOWDHURY, R. et al. Ipolamiide and α -spinasterol from *Stachytarpheta urticaefolia*. **Biochemical Systematics And Ecology**. v. 31, p.1209-1211. 2003.

COGLIATTI-CARVALHO, L., FREITAS, A.F.N. de, ROCHA, C.F.D. da, VAN SLUYS, M. Variation in structure and composition of Bromeliaceae at five zones of "restinga" in Jurubatiba National Park, Macaé, RJ. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2001.

COQUEIRO A., REGASINI L. O., SKRZEK S. C., QUEIROZ M. M., SILVA D. H., DA SILVA BOLZANI V. Free radical scavenging activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). **Molecules**. v. 18, n. 2, p. 2376 – 2385, 2013.

CORRÊA, Maria Fernanda P.; MELO, Gianny O. de; COSTA, Sônia S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, p.785-797, dez. 2008.

COUTINHO, Marcela A.S.; MUZITANO, Michele F.; COSTA, Sônia S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v. 1, n. 3, p.241-256, jun. 2009.

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.

CRIADO, Paulo Ricardo et al. Urticária. **An Bras Dermatol**. v. 80, n. 6, p.613-630. 2005.

CRUZ, Elaine dos Anjos da. **Choque anafilático: modulação pelo *Kalanchoe pinnata* e o papel do TNF- α** . 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), UFRJ/IBCCF, Rio de Janeiro, 2006.

CRYSTAL-PETERS, J. ; NESLUSAN, C.; CROWN, W.H.; TORRES, A. Treating allergic rhinitis in patients with comorbid asthma: The risk of asthma related hospitalizations and emergency department visits. **J. Allergy Clin. Immunol**. v. 109, p. 57-62, 2002.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: **old and**

new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences, v.65, n.4, p. 337-353, 1999.

DÍAZ, A. M.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, L.; SILVÁN, A. M.; DE SANTOS, J.; BERMEJO, P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflammatory activity. **Life sciences**. v. 74, p. 2515-2526, 2004.

DIONISIO, Rafaela Gonçalves. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante da Espécie *Stachytarpheta crassifolia* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil.** 2014. 95 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé, Macaé, 2014.

DITTRICH, V. A. O. ***Stachytarpheta crassifolia* subsp. ,minasesis (Verbenaceae), Reserva Biológica da Mata Escura, Jequitinhonha, MG, Brasil.** Panoramio. Disponível em: < <http://www.panoramio.com/photo/9151940>>. Acessado em: 6 abr. 2015.

DURASAMY, K.; MADHAPPAN, B.; CHRISTODOULOU, S.; BOUCHER, W.; CAO, J.; PAPADOPOULOU, N.; CETRULO, C.L.; THEOHARIDES, T.C. **Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells.** British Journal of Pharmacology., v.145, p.934-944, 2005.

FERREIRA, Bárbara Ingrid Alves Lacerda de Souza et al. Dermatites: diagnóstico e terapêutica. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research.** Minas Gerais, v. 5, n. 2, p. 22-26, fev 2014.

FERREIRA, Fernanda Peres. **Gêneros tóxicos da nossa flora: química e biologia.** 2011. 248 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

FERREIRA, Gabriela Lícia Santos. **Mastócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por *Toxoplasma Gondii* (cepas RH e ME-49).**2005. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biomédicas, Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FERREIRA, Tarina Lins. **Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica.** 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Farmacologia, Unesp, Botucatu, 2011.

FILHO, Valdir Cechinel; YUNES, Rosendo A.. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**. v. 21, n. 1, p. 99-105. 1998.

FOGARTY, Andrew W.. What have studies of non-industrialized countries told us about the cause of allergic disease? **Clinical & Experimental Allergy**, Nottingham, v. 45, p.87-93. 2015.

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

GALVÃO, Clóvis Eduardo Santos; CASTRO, Fábio F. Morato. As alergias respiratórias. **Rev Med**, São Paulo, v. 84, n. 1, p.18-24, jan.-mar. 2005.

GIULIETTI, Ana Maria *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, p.52-61, jul. 2005.

GOULART, Y.C.F., SELA, V.R., OBICI, S., MARTINS, J.V.C., OTOBONE, F., CORTEZ, D.A.G., AUDI, E.A. Evaluation of gastric antiulcer activity in ahydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 211–216. 2005.

GOWERS A, CULLINAN P, AYRES J et al. Does outdoor air pollution induce new cases of asthma? Biological plausibility and evidence; a review. **Respirology**.v.17.p. 887–98. 2012.

HENNINO A, BÉRARD F, GUILLOT I, SAAD N, ROZIÈRES A, NICOLAS JF. Pathophysiology of urticaria. **Clin Rev Allergy Immunol**. v. 30, p. 3–11. 2006.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**. v, 27, p. 713-722, 1996.

HUANG, Shau-ku et al. Mechanistic impact of outdoor air pollution on asthma and allergic diseases. **Journal Of Thoracic Disease**. v. 7, n. 1, p. 23-33, jan 2015.

IKAWATI, Zullies; WAHYUONO, Subagus; MAEYAMA, Kazutaka. Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL-2H3 cells. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 75, p.249-256, 2001.

INCORVAIA C; FRATI F; SENSI L; RIARIO-SFORZA GG; MARCUCCI F. Allergic inflammation and the oral mucosa. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov** v. 1, n. 1, p.35-38, fev. 2007.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Histamine in chronic allergic responses. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v.15, p.1-8, 2005.

KALESNIKOFF J, GALLI SJ. Anaphylaxis: mechanisms of mast cell activation. **Chem Immunol Allergy**. v. 95, p. 45–66. 2010.

KAWAKAMI, T.; GALLI, S. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. **Nature reviews: Immunology**, London, v. 2, p. 773-783, 2002.

KELECOM, A., REIS, G.L., FEVEREIRO, P.C., SILVA, J.G., SANTOS, M.G., MELLO NETO, C.B., GONZALEZ, M.S., GOUVEA, R.C. e ALMEIDA, G.S. A multidisciplinary approach to the study of the fluminense vegetation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 171-181, 2002.

KIMATA, M.; SHICHIJO, M.; MIURA, T.; SERIZAWA, I.; INAGAKI, N.; NAGAI, H. **Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells**. *Clinical & Experimental Allergy*, v.30, p.501-508, 2000.

KONTOGIORGIS, C; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agentes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v.18, p.63-69, 2003.

KOYASU S, MORO K. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. **Immunology** v. 132, n. 4, p.475-481, abr. 2011.

KUNZLI N, KAISER R, STUDNICKA M et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. **Lancet**. v. 356, p. 795–801.2000.

LEAL, M. C. R. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante de *Stachytarpheta schottiana* (SCHAUER) E *Stachytarpheta crassifolia* (RICH.) VAHL (VERBENACEAE) Do parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil**. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2014.

LEURS R, CHURCH MK, TAGLIALATELA M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Clin Exp Allergy**. v. 32, n. 4, p. 489-98, abr. 2002.

LOPES, R. A. ; PIVATO, L. S. HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA: UMA REVISÃO SOBRE ANAFILAXIA. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 147-160, jan./abr. 2012.

MAINTZ L, NOVAK N. Histamine and histamine intolerance. **Am J Clin Nutr.** v. 85, p. 1185-06. 2007.

MARONE G, TRIGGIANI M, GENOVESE A, DE PAULIS A. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. **Adv Immunol.** v. 88, p. 97–160. 2005.

MARTINS, J.V.C., OTOBONE, F.J., SELA, V.R., OBICI, S., TROMBELLI, M.A., CORTEZ, D.A.G., AUDI, E.A. Activity of hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea* stems on central nervous system in rats. **Acta Scientiarum Health Sciences.** v. 26, p. 365–368. 2004.

MARTINS, Manoela Domingues et al. Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v. 8, n. 1, p.99-104, 2009.

MAYR, S.I.; ZUBERI, R.I.; LIU, F.T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 36, p. 821-827, 2003.

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

MONTEZUMA, R. C. M. & ARAUJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro. **Pesquisas, Botânica.** n. 58, p.157-176, 2007.

MOREIRA, Priscila Ferreira de Sousa. **Reatividade anticórpica IgE, IgG1 e IgG4 específica a antígenos de pólen de *Lolium multiflorum* (Lam. 1779) em pacientes com polinose.** 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, UFU, Uberlândia, 2006.

MUSAFIRI S, MEERBEECK J, MUSANGO L et al. Prevalence of atopy, asthma and COPD in an urban and a rural area of an African country. **Respir Med.** v. 105, p. 1596–605. 2011.

MUSTAPHA B, BRIGGS D, HANSELL A. Prevalence of asthma and respiratory symptoms in children in a low socio-economic status area of Nigeria. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 17, p. 982–8. 2013.

NOGUEIRA P. C. L., ANDRADE M. S., ANDRADE L. M., MORAES V. R. S., RIBEIRO A. S., BITTRICH V., AMARAL M. C. E., FERREIRA A. G., ALCÂNTARA G. B., LEÃO K.V., ALVES P. B. Chemical constituents from *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 36, p. 921 – 924, 2009.

NOLASCO, A. P. *et. al.* Aspectos florísticos e fitossociológicos da vegetação de entre-moitas em um trecho de uma restinga de Praia do Forte, município de Mata de

São João, litoral norte do Estado da Bahia. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 18, n.1, p. 42 – 48. 2012.

NUNES, Clara dos Reis et al. Inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico de extrato aquoso de *Annona muricata* L. **Perspectivas Online**. v. 1, n. 2, 2011.

OLIVEIRA A. C., BRITTO A. C., HENRIQUES R. M., CARDOSO G. M., ANJOS C. S., JESUS A. M., COSTA E. V., MORAES V. R., NOGUEIRA P. C., BEZERRA D. P.. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by *Kielmeyera rugosa* Choisy (Calophyllaceae). **Natural Product Research**. v. 27, n. 23, p. 2248 – 2250. 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.

OLIVEIRA, D. M. S. Isolamento do Verbascosídeo e Validação do Método Analítico para Padronização do Extrato Bruto das Partes Aéreas de *Buddeja stachyoides* Cham. & Schldl. (Scrophulariaceae). **Quim. Nova**. v. 37, n. 2, p. 344-348, 2014.

PAES, Bruno Meirelles. **Potencial farmacológico de Kielmeyera membranacea no sistema cardiovascular: investigação da atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas e frações**. 2014. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé, Macaé, 2014.

PEDROSA, Alano Martins. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PIVATO, Leandro Silva; LOPES, Renan Alves. Hipersensibilidade imediata: uma revisão sobre anafilaxia. **Revista Saúde e Pesquisa**, São Paulo, v. 5, n. 1, p.147-160, abr. 2012.

PLATTS-MILLS TA, ERWIN E, HEYMANN P, WOODFOLK J. Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma? **Allergy**.2005;60(Supl 79):25-31.

PONTE, Eduardo et al. Programa de controle da asma e da rinite alérgica na Bahia (ProAR) – Um modelo de integração entre assistência, ensino e pesquisa. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v. 28, n. 1, p.124-132, jan-jun. 2004.

PRAIA, Adriana da Silva et al. **Compostos Fenólicos** .2014. Disponível em: <http://www.procitropicos.org.br/portal/conteudo/print.php?itemid=2911>. Acesso em: 06/05/2015.

QUIRCE, Santiago; BERNSTEIN, Jonathan A. Old and New Causes of Occupational Asthma. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 31, n. 4, p.677-698, nov. 2011.

RASKIN I; RIBNICKY DM; KOMARNYTSKY S; ILIC N; POULEV A; BORISJUK N; BRINKER A; MORENO DA; RIPOLL C; YAKOBY N; O'NEAL JM; CORNWELL T; PASTOR I; FRIDLENDER B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnol**. v. 20, p.522-531. 2002.

RECH, R. R., GRAÇA, D. L. Mastócitos em condições normais e patológicas. **Vet. Not**. Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 51-60, jan.-jun. 2006.

RIVEIRO, M. E., et al. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. **Current Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 1325-1338, 2010.

ROBBIE-RYAN, M.; BROWN, M. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. **Curr Opin Immunol**. v. 14, n. 6, p. 728-733, dez. 2002.

RUHFEL B. R., BITTRICH V., BOVE C. P., GUSTAFSSON M. H. G., PHILBRICK C. T., RUTISHAUSER R., XI Z., DAVIS C. C.. Phylogeny of the clusioid clade (MALPIGHIALES): Evidence from the plastid and mitochondrial genomes. **American Journal of Botany**. v. 98, n. 2, p. 306 – 325, 2011.

SANDERS RW. The genera of *Verbenaceae* in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**. v. 5, p. 303 – 358, 2001.

SANTOS, Marcela de Souza. **Estudo da sinalização de mastócitos mediada por IgE: desenvolvimento de inibidores e efeito de níveis reduzidos de fofatidilinositol 4,5-bifosfato**. 2012. 164 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SCHANEBERG BT; CROCKETT S; BEDIR E; KHAN IA. The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. **Phytochemistry**. v. 62, p. 911-918. 2003.

SCHAPOVAL, E. E. S.; DE VARGAS, W.; CHAVES, C. G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts

and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, p. 53-59, 1998.

SILVA, Maria das Graças Nascimento; NASPITZ, Charles K.; SOLÉ, Dirceu. Qualidade de vida nas doenças alérgicas: Por que é importante avaliar? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 23, n. 6, p.260-269. 2000.

SILVA, P. S. *et.al.* *Stachytarpheta gesnerioides* Cham.: chemical composition of hexane fraction and essential oil, antioxidant and antimicrobial activities. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.11, n.2, p., s. I.,542-548, 2012.

SIMÕES C.M.O., SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MELLO J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK P.R. (ORGS). Farmacognosia da planta ao medicamento, 6ª Edição. Rio Grande do Sul. Editora UFRGS, 2010.

SINGHA, Baljinder et al. The hydroalcoholic extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves and its major compound rhein exhibits antiallergic activity via mast cell stabilization and lipoxygenase inhibition. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 141, p.469-473, 2012.

SOBRAL I. S., SOUZA – NETA L. C., COSTA G. A. N., GUEDES M. L. S., MARTINS D., CRUZ F. G.. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 3, p. 686 – 689, 2009.

SOUZA Z. L., DE OLIVEIRA F. F., DA CONCEIÇÃO A. O., SILVA L. A., ROSSI M. H., SANTOS J. S., ANDRIOLI J. L.. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 10, p. 11 – 20, 2012.

TAUR, DJ; PATIL, RY. Mast cell stabilizing and antiallergic activity of *Abrus precatorius* in the management of asthma. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**. p.46-49, 2011.

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.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**. v. 28, n. 3, p.519-528. 2005.

VENERO-FERNANDEZ S, SUAREZ MEDINA R, MORA-FAIFE E et al. Risk factors for wheezing in infants born in Cuba. **QJM**. v. 106, p. 1023–9. 2013.

VICCINI, Lyderson F. et al. Ipolamiide and fulvoipolamiide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic characterization. **Journal Of Molecular Structure**. v. 875, p. 27-31. 2008.

VIINANEN A, MUNHBAYARIAH S, ZEVGEE T et al. Prevalence of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and allergic sensitization in Mongolia. **Allergy**. v. 60, p. 1370–7. 2005.

VLIAGOFTIS H, BEFUS AD. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. **Immunol Rev**. v. 206, p. 190–203, ago. 2005.

WAFFO, A. K., et al. Indicanines B and C, two isoflavonoid derivatives from the rootbark of *Erythrina indica*. **Phytochemistry**. v. 53, p. 981-985, 2000.

WANDERLEY, Emanuela Nogueira; FERREIRA, Vanessa Alves. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, Minas Gerais, v. 15, n. 1, p.185-194, 2010.

WARNER JO, KALINER MA, CRISCI CD, DEL GIACCO S, FREW AJ, LIU GH, et al. Allergy practice worldwide: a report by the world allergy organization specialty and training council. **Int Arch Allergy Immunol**. v.139, p.166–74. 2006.

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

WILLART MA, HAMMAD H. Alarming dendritic cells for allergic sensitization. **Allergol Int** v. 59, n. 2, p.95-103, jun. 2010.

XIONG, Q.; TEZUKA, Y.; KANEKO, T.; LI, H.; TRAN, L. Q.; HASE, K.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrofages. **European Journal of Pharmacology**. v. 400, p. 137-144, 2000.

YOSHIDA, M.; TAKAHASHI, Y.; INOUE S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology**. v.114, p.334-342, 2000.

YU CK, CHEN CL. Activation of mast cells is essential for development of house dust mite *Dermatophagoides farinae*-induced allergic airway inflammation in mice. **J Immunol**. v. 171, n. 7, p. 3808–15, out. 2003.