

Tarina Lins Ferreira

Prospecção de inibidores da secreção de  
histamina a partir de espécies vegetais  
do Cerrado e da Mata Atlântica

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências Biológicas,  
Área de concentração: Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi**

Botucatu

2011

Tarina Lins Ferreira

# Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica

Dissertação para obtenção do título de mestre

Comissão Julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

2º Examinador: Profa. Dra. Alessandra Gambero

3º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Orsi

**Auxílio financeiro:**



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo



(Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior)

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”.

Winston Churchill

## **Dedicatória**

“Para meus pais, José e Ivânia Lins, que por amor dedicaram da vida os melhores momentos, para tornarem possível minha existência. E como foram importantes suas palavras de estímulo, frente por vezes, ao desânimo pelo esforço diário. Vocês foram a força que me impulsionou, me fazendo acreditar que a realização do sonho era possível”.

À Deus, sempre, por permitir e iluminar cada passo. Pelas pessoas boas que sempre estão em meu caminho, pelas oportunidades, pela força, pela vida.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi por me orientar, dando-me condição de uma visão crítica, para que não tropeçasse na obscuridade da ignorância. Minha gratidão à aquele que repartiu seus conhecimentos, com dedicação e renúncias pessoais ensinando-me a arte de construir um hoje comprometido com o amanhã.

Ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências por criar condições objetivas para a produção deste estudo.

Ao Luiz Antônio de Oliveira, assistente de suporte técnico acadêmico, pela sua paciência, pelo seu respeito ao meu aprendizado, a sua colaboração e incentivo durante meu mestrado.

Ao Dr. Leonardo Noboru Seito e ao Prof. Adriano Cressoni pela orientação, paciência e amizade.

À Ana Elisa Quaglio, Carolina Luchini, Patrícia Orsi, Laura Orsi, Adriana Del Ben, Alexandre Chagas, Juliana Severi e Andrea Fruet que contribuíram durante todo o processo e me premiaram com companheirismo, apoio e incentivo em todos os momentos.

Pequenos, grandes, de estimação e produção, são e serão fundamentais em nossos estudos, pesquisas e descobertas. Companheiros e amigos presentes durante a realização deste sonho. Muitas vezes doaram suas vidas sem egoísmo ou ressentimento para que pudéssemos aprender mais a cada dia. Aprendi a ver vocês com outros olhos, diferentes daqueles com a qual estava acostumada. Assumi, então, o risco de parecer cruel aos olhos daqueles que estão de fora, conscientes de que tudo sempre foi realizado com muito respeito. Obrigado por ensinarem um pouco mais da vida.

“No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender.” (Mahatma Gandhi)

Obrigada...

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Lista de Figuras</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>Lista de Tabelas</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>Introdução</b> .....   | <b>18</b> |
| 1. A busca de novos compostos para o tratamento de doenças alérgicas..... | 5         |
| 2. Espécies vegetais selecionadas.....                                    | 7         |
| 2.1. <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze .....                 | 7         |
| 2.2. <i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich ex Juss .....                    | 9         |
| 2.3. <i>Caesalpinia ferrea</i> L. ....                                    | 10        |
| 2.4. <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....                     | 12        |
| <b>Objetivos</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>Material e Métodos</b> .....   | <b>16</b> |
| 1. Material Vegetal.....  | 17        |
| 1.1. Coleta do material vegetal.....                                      | 17        |
| 1.3. Animais .....  | 18        |
| 1.4. Obtenção das suspensões celulares contendo mastócitos .....          | 18        |
| 1.5. Incubações das suspensões celulares.....                             | 19        |
| 1.7. Desafio das células mastocitárias .....                              | 20        |
| 2. Extração e dosagem automática de histamina .....                       | 20        |
| 3. Apresentação dos resultados.....                                       | 22        |
| 4. Análise estatística .....  | 23        |
| <b>Resultados</b> .....   | <b>24</b> |
| 1. <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze.....                    | 25        |
| 1.1. Caule.....   | 25        |
| 1.2. Raiz .....   | 29        |
| 1.1. Semente .....  | 33        |
| 2. <i>Byrsonima Verbascifolia</i> Rich ex Juss.....                       | 37        |
| 2.1. Caule.....   | 37        |
| 2.2. Folhas .....   | 41        |
| 3. <i>Caesalpinia ferrea</i> L.....                                       | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1. Folhas .....                                    | 45        |
| 4. <i>Hymeneae stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne ..... | 49        |
| 4.1. Caule .....                                     | 49        |
| 4.2. Folha .....                                     | 53        |
| <b>Discussão .....</b>                               | <b>57</b> |
| <b>Conclusão .....</b>                               | <b>64</b> |
| <b>Bibliografia.....</b>                             | <b>66</b> |

## Lista de Figuras

**Figura 1.** *Acanthospermum australe*. Folhas e parte reprodutiva.

**Figura 2.** *Byrsonima verbascifolia*. Inflorescência em racemos densos.

**Figura 3:** *Caesalpinia ferrea*. Ramos e Inflorescência.

**Figura 4:** *Hymenaea stigonocarpa*. Flores e inflorescência.

**Figura 5:** Condensação da histamina com o OPT.

**Figura 6:** Efeitos do extrato do caule da *Acanthospermum australe* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 7:** Efeitos do extrato do caule de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo).

**Figura 8:** Efeitos do extrato do caule de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 9:** Efeitos do extrato da raiz da *Acanthospermum australe* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 10:** Efeitos do extrato da raiz de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação).

**Figura 11:** Efeitos do extrato da raiz de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 12:** Efeitos do extrato da semente da *Acanthospermum australe* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 13:** Efeitos do extrato da semente de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle).

**Figura 14:** Efeitos do extrato da semente de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 15:** Efeitos do extrato do caule da *Byrsonima verbascifolia* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 16:** Efeitos do extrato do caule da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle).

**Figura 17:** Efeitos do extrato do caule da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 18:** Efeitos do extrato das folhas da *Byrsonima verbascifolia* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 19:** Efeitos do extrato das folhas da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle).

**Figura 20:** Efeitos do extrato das folhas da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 21:** Efeitos do extrato das folhas da *Caesalpinia ferrea* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 22:** Efeitos do extrato das folhas da *Caesalpinia ferrea* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle).

**Figura 23:** Efeitos do extrato das folhas da *Caesalpinia ferrea* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 24:** Efeitos do extrato do caule da *Hymenaea stigonocarpa* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 25:** Efeitos do extrato do caule da *Hymenaea stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle).

**Figura 26:** Efeitos do extrato do caule da *Hymenaea stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo 48/80).

**Figura 27:** Efeitos do extrato das folhas da *Hymenaea stigonocarpa* na ausência de compostos secretores. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM.

**Figura 28:** Efeitos do extrato das folhas da *Hymeneae stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle).

**Figura 29:** Efeitos do extrato das folhas da *Hymeneae stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  em relação ao grupo 48/80).

## Lista de Tabelas

**Tabela I.** Lista de plantas medicinais referidas como úteis em doenças alérgicas e de hipersensibilidade.

**Tabela II:** Espécies vegetais selecionadas.

**Tabela III.** Solução Tyrode.

**Tabela IV:** Efeito inibitório dos extratos do caule de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela V:** Efeito inibitório dos extratos da raiz de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela VI:** Efeito inibitório dos extratos da semente de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela VII:** Efeito inibitório dos extratos do caule da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela VIII:** Efeito inibitório dos extratos das folhas da *Caesalpinia ferrea* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela IX:** Efeito inibitório dos extratos das folhas da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela X:** Efeito inibitório dos extratos do caule da *Hymenocarpus stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

**Tabela XI:** Efeito inibitório dos extratos das folhas da *Hymeneae stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores.

## Resumo

A histamina é um mediador que participa de uma série de doenças como asma alérgica e outros processos alérgicos e de hipersensibilidade, assim como da resposta inflamatória, reações de pigmentação da pele e úlcera gástrica. Desta forma, a inibição de sua liberação pode contribuir com a produção de efeitos benéficos, preventivos ou curativos, destas doenças. A prospecção a partir de produtos naturais encontra nas espécies vegetais a principal e mais promissora fonte de novas moléculas. Na busca de novos ativos e com base em estudos etnofarmacológicos, quatro espécies vegetais foram selecionadas com bases em dados etnofarmacológicos para serem estudadas com o objetivo de realizar uma triagem preliminar *in vitro* de espécies medicinais inibidoras da secreção de histamina a partir de mastócitos. A atividade inibitória de extratos metanólicos de diferentes partes das espécies *Acanthospermum australe* (Loefl.)Kuntze, *Byrsonima verbascifolia* Rich ex Juss, *Caesalpinia ferrea* L. e *Hymenaea stigonocarpa* foi avaliada em mastócitos peritoneais de ratos em condições normais e após estímulo da liberação de histamina induzido por agentes secretagogos, o composto 48/80 e Ionóforo A 23187. A liberação mastócitaria de histamina foi realizada pelo método fluorométrico automático utilizando-se um sistema de fluxo contínuo modular automático. Todas as espécies não influenciaram a liberação espontânea de histamina, assim como foram capazes de inibir de forma diferenciada a liberação de histamina induzida pelos agentes secretagogos, destacando-se os efeitos produzidos pelos extratos de caule e folhas de *Hymenaea stigonocarpa* e folhas de *Caesalpinia ferrea*, as quais se apresentam como espécies promissoras para estudos *in vivo* e de fracionamento biomonitorado de seus constituintes químicos ativos.

## Abstract

Histamine is a mediator that participates in a number of diseases like asthma and other allergic and hypersensitivity processes, as well as inflammatory responses, skin pigmentation and gastric ulcer. In this way, the inhibition of its release may contribute to the production of beneficial effects, preventive or curative, on these diseases. The research of natural products found in plant species the main and most promising source of new molecules. In the search of new active products and based on ethnopharmacological studies, four plant species were selected to be studied in order to perform a preliminary screening of medicinal species with inhibitory activity on histamine secretion from mast cells. The inhibitory activity of methanol extracts from different parts of the *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, *Byrsonima verbascifolia* Rich ex Juss, *Caesalpinia ferrea* L. and *Hymenaea stigonocarpa* was evaluated using rat peritoneal mast cells in normal conditions and after stimulation of histamine release induced by the secretagogues agents such as compound 48/80 and ionophore A 23187. The mast cell release of histamine was analyzed by automatic fluorometric method using a continuous and automatic flow system. All species did not affect the spontaneous release of histamine and were able to differentially inhibit histamine release induced by secretagogue agents, highlighting the effects produced by extracts from leaves and stems of *Hymenaea stigonocarpa* and leaves of *Caesalpinia ferrea*, which are presented as a promising species for *in vivo* studies and bioassay-guided fractionation of active chemical constituents.



# Introdução

Os mastócitos são células secretoras multifuncionais do sistema imune que participam da resposta imune por meio da liberação de mediadores químicos, frente a um estímulo apropriado (Zhao *et al.*, 2001), tendo papel central na imunidade inata e adquirida (Kirshenbaum, 2000; Metcalfe *et al.*, 1997).

Estas células secretoras foram descritas em 1878 por Paul Ehrlich com base em uma série de experimentos, os quais também permitiram identificar os primeiros indícios do papel dos mastócitos, sua associação com tecidos inflamados, vasos sanguíneos, nervos e focos neoplásicos (Rang *et al.*, 2004). Sua principal função é armazenar potentes mediadores químicos da inflamação, como a histamina, heparina, ECF-A (fator quimiotático dos eosinófilos), serotonina e fatores quimiotáticos dos neutrófilos (Galli *et al.*, 2005).

Os mastócitos possuem origem hematopoiética e circulam no sangue e no sistema linfático antes de migrarem para os tecidos, onde adquirem suas características finais. São encontrados principalmente na pele e mucosa, sendo derivados das células mesenquimatosas circulantes no sangue e linfa (Gurish *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2001; Benoist & Mathis, 2002).

É evidente a contribuição das células mastocitárias no processo patológico e fisiológico nas doenças inflamatórias. A ativação e acúmulo destas células são observados em diversas inflamações crônicas e processos fibróticos, tais como, na esclerose múltipla, artrite reumatóide, sarcoidoses, doença de Cronh, parasitoses e cicatrização de tecidos (Benoist & Mathis, 2002). Os mastócitos também participam de forma direta nas reações anafiláticas, conhecidas como reação de hipersensibilidade tipo I, assim como no processo de secreção gástrica (Riley & West, 1983; Rang *et al.*, 2004).

Os mastócitos possuem importância fundamental na defesa do organismo, sendo um dos componentes principais da reação inflamatória. Após sua sensibilização, ocorre a liberação de diversos mediadores inflamatórios incluindo a histamina, prostaglandina, heparina, leucotrienos e citocinas proinflamatórias (Katzung, 2007).

Dentre os mediadores liberados, a histamina é um potente representante químico que possui uma variedade de papéis biológicos, que incluem,

vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, contração bronquial, contração dos músculos lisos intestinais e aumento da produção de muco (Zhao *et al.*, 2001; Lagunoff, 1973, Petersen *et al.*, 1996). Ela compõe mais de 10% do conteúdo total do mastócito, sendo responsável por diversos efeitos pertinentes a respostas alérgicas (Jarrett & Haig, 1984). O mecanismo fisiopatológico da liberação da histamina pode ocorrer através de estímulos imunológicos ou não.

A ativação da desgranulação dos mastócitos por estímulo imunológico ocorre via ativação dos receptores da imunoglobulina E (IgE). Quando um antígeno entra em contato com os anticorpos IgE eles se fixam aos mastócitos e basófilos, sensibilizando-os. Tal processo promove a expulsão dos grânulos dos mastócitos para o meio extracelular, expondo seu conteúdo (Ferrer *et al.*, 2002; Lagunoff, 1973, Katzung, 2007).

Além da ativação da desgranulação dos mastócitos por estímulo imunológico, a desgranulação mastocitária também pode ocorrer por sinalização de receptores de superfície celular.

Algumas drogas, tais como, venenos, toxinas, morfina, penicilinas, substância P, dextran, alcalóides e aminas são capazes de induzir a liberação da histamina sem sensibilização prévia. Esse tipo de liberação não requer energia e não está associado à lesão celular, sendo esta ação caracterizada pela atuação sobre o cálcio intracelular (Ward & Newman, 1969; Johnson *et al.*, 1975; Paton, 1957; Ferry *et al.*, 2002).

O conceito do envolvimento de pequenas moléculas com potencial biológico na patogênese de reações alérgicas teve início com a descoberta da beta-imidazoetilamina, conhecida como histamina. A histamina foi a primeira de uma série de aminas biológicas liberadas durante o processo inflamatório a ser caracterizada. Ela é amplamente distribuída nos reinos vegetal e animal, de unicelulares a organismos superiores (Emanuel, 1999).

Dale e Laidlaw isolaram a histamina pela primeira vez em 1907 a partir de extratos do esporão de centeio. Essa substância foi tratada como curiosidade química devido à capacidade de promover estímulos uterinos. Sua importância

biológica foi reconhecida em 1910, quando suas atividades foram constatadas após a realização de uma série de estudos (Best *et al.*, 1927).

Outros locais de formação e estoque de histamina não mastocitários incluem as células de Langerhans da epiderme, as células tipo enterocromafins da mucosa gástrica, alguns neurônios do Sistema Nervoso Central e células de tecidos em regeneração ou de rápido desenvolvimento. Após sua liberação, a histamina apresenta papel chave nas respostas alérgicas e de hipersensibilidade (Rang *et al.*, 2004; Emanuel, 1999; Parsons & Ganellin, 2006).

Na fisiopatologia da asma alérgica, assim como em outros processos alérgicos e reações de hipersensibilidade, a liberação de histamina explica parcialmente os efeitos biológicos observados nestes processos, visto que uma grande série de outros mediadores também está envolvida. A estimulação de receptores IgE ativa os receptores H<sub>1</sub> que, por sua vez, estimulam a fosfolipase A<sub>2</sub> levando a produção de diferentes mediadores, incluindo o fator de agregação plaquetária e metabólitos do ácido aracdônico. Adicionalmente, cininas e tromboxanos também participam como mediadores da resposta inflamatória (Barnes, 1996; Holgate, 2000; Church & Levi-Schaffer, 1997).

É indiscutível a importância da histamina como mediador em inúmeros processos fisiopatológicos, assim como seu papel chave em várias manifestações clínicas. Dentre estas se destacam o choque anafilático, prurido, eczema, rinite alérgica, asma, alergias alimentares, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, aumento da produção e secreção de muco pulmonar (Ferre *et al.*, 2002; Jutel *et al.*, 2005).

Na pele, a histamina também está implicada com as dermatites alérgicas, assim como nas dermatites de contato. Age como importante mediador dos processos de irritação dérmica causados por diferentes agentes etiológicos, inclusive com o uso tópico de produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, a histamina também desempenha papel importante no processo de pigmentação da pele, implicando nas respostas inflamatórias decorrentes da exposição à irradiação ultravioleta (Yoshida *et al.*, 2000; Wille & Kydonieus, 2000).

Além do envolvimento nos processos acima, a histamina é um dos principais mediadores na ulceração gástrica, sendo responsável, após a ocupação de receptores H<sub>2</sub> na célula parietal, pela ativação da via AMPc dependente que, por sua vez, ativa a secreção de íons H<sup>+</sup> para a luz do estômago, onde irá contribuir com a formação de ácido clorídrico e redução do pH estomacal (Skidgel & Erdos, 2006; Luque & Illos, 1986).

Os processos fisiológicos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores presentes na superfície das membranas, denominados H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>. Todos pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G e compartilham similaridades entre si (Criado *et al.*, 2010; Thurmond *et al.*, 2008).

Os receptores histamínicos H<sub>1</sub> são distribuídos em uma variedade de tecidos, SNC, músculos lisos, sistema cardiovascular, células endoteliais e linfócitos (Katzung, 2007). Os receptores H<sub>2</sub> são principalmente expressos em músculos lisos vasculares, vias aéreas, endotélios, hepatócitos e principalmente em células parietais (Rang *et al.*, 2004). Os receptores H<sub>3</sub> são predominantemente encontrados no cérebro, onde possuem função de receptores pré-sinápticos, modulando a liberação de diversos neurotransmissores, incluindo a própria histamina (Hough, 2001; Clapham & Kilpatrick, 1992; Jutel *et al.*, 2005). Os receptores H<sub>4</sub>, por sua vez, são encontrados principalmente em células de origem hematopoiéticas, em particular de 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 (Thurmond *et al.*, 2008; Coge *et al.*, 2001; Zampeli e Tiligada, 2009; Thurmond *et al.*, 2008), mas pouco se sabe sobre este receptor, apesar de estudos demonstrarem que os receptores H<sub>4</sub> são expressos em células envolvidas nos processos inflamatórios (Thurmond *et al.*, 2004).

## **1. A busca de novos compostos para o tratamento de doenças alérgicas**

Considerando-se a importância da histamina na fisiopatologia de inúmeras doenças, associado ao fato de que os fármacos disponíveis até o momento atuam como antagonistas diretos de receptores histaminérgicos (especialmente sobre receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>) e os inúmeros efeitos adversos que estes produtos provocam no organismo vivo, verifica-se claramente a necessidade de uma busca criteriosa de novos produtos que possam modular a resposta da histamina sobre os diferentes tecidos e órgãos nos quais os processos patológicos descritos podem ocorrer.

Uma destas estratégias é baseada na seleção e estudo de produtos que sejam capazes de inibir a secreção de histamina a partir das células produtoras deste mediador, especialmente os mastócitos encontrados em diferentes tecidos e órgãos. A inibição da secreção de histamina produziria como ação imediata uma menor disponibilidade deste mediador e, conseqüentemente, reduzida ocupação de seus respectivos receptores, acarretando em diminuição direta de seus efeitos (Park *et al.*, 2008; Senol *et al.*, 2006).

De forma distinta dos fármacos antagonistas dos receptores para a histamina, compostos com a capacidade de inibirem a secreção de histamina podem causar uma resposta imediata, assim como serem úteis para o tratamento de diferentes doenças na qual a histamina está implicada como um mediador chave (Katzung, 2001; Rang *et al.*, 2004).

A busca de novos medicamentos pode ser feita através de inúmeras estratégias, especialmente pela modificação molecular de compostos ativos já existentes, síntese de novas moléculas e a bioprospecção a partir de produtos de origem natural, esta última sendo a principal fonte de protótipos que originaram as principais classes farmacológicas de compostos utilizados na medicina moderna (Chiriboga & Di Stasi, 2006). De fato, a prospecção a partir de produtos naturais encontra nas espécies vegetais a principal e mais promissora fonte de novas

moléculas que fazem parte da história da farmacologia como a morfina, atropina, os antineoplásicos vincristina e vimblastina, a emetina entre muitos outros e, mais recentemente compostos novos e de grande importância como o antimalárico artemisinina e o antineoplásico taxol (Chiriboga & Di Stasi, 2006).

A busca de novos ativos de origem vegetal também exhibe outra particularidade importante relacionada ao critério de seleção de espécies vegetais para a realização dos estudos farmacológicos, toxicológicos e fitoquímicos. Dentre estes, destaca-se a abordagem etnofarmacológica, que considera os usos populares e tradicionais de espécies vegetais como produto de valor medicinal. Além de representar grande parte das descobertas de novos fármacos, a etnofarmacologia reveste-se de maior importância como estratégia de seleção de espécies vegetais em países como o Brasil, onde uma grande diversidade biológica vegetal está aliada a um amplo conhecimento popular e tradicional de suas virtudes, especialmente nos mais variados grupos étnicos e populacionais que vivem no interior ou no entorno dos biomas brasileiros (Di Stasi, 2005). De fato, o estudo de plantas medicinais como fonte de novos produtos para o tratamento de problemas alérgicos tem sido realizado de forma intensa como uma estratégia promissora para a obtenção de novos compostos terapêuticos (Bierlory, 2004).

É importante constar ainda que a demanda de produtos de origem vegetal no mercado é alta, mas o uso das espécies vegetais nativas é complexo visto à falta de informações técnico-científicas que permitem sua seleção como matéria-prima para a produção industrial (Elisabetsky, 1999).

Deve-se salientar que, além da enorme diversidade de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica, praticamente inexplorada pela ciência, existe uma diversidade química incomensurável nestas espécies vegetais. Tais compostos químicos, oriundos do metabolismo secundário e que garantem a sobrevivência da espécie em condições tão inóspitas e de intensa competição como a que ocorre no Cerrado e na Mata Atlântica, podem, obviamente, representar uma série de importantes princípios ativos úteis para o tratamento e cura de inúmeras doenças que atingem a espécie humana (Di Stasi, 2005).

Com base em estudos etnofarmacológicos, foi elaborada uma lista de espécies vegetais utilizadas popularmente para o tratamento e alívio de sintomas de doenças na qual a histamina possui importante papel como mediador. Com ênfase nas plantas utilizadas contra bronquites, asma, coceiras, problemas respiratórios e alergias, assim como em publicações referentes a cada uma das espécies medicinais, as quatro espécies listadas na Tabela I foram selecionadas como produtos prioritários para a realização do presente estudo.

Tabela I. Lista de plantas medicinais referidas como úteis em doenças alérgicas e de hipersensibilidade.

| <b>Espécie</b>                                 | <b>Família</b>  | <b>Nome popular</b> | <b>Parte usada</b>    | <b>Referência</b>   |
|--|-----------------|---------------------|-----------------------|---|
| <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze | Asteraceae      | Carrapichinho       | Caule, raiz e semente | Maroni <i>et al.</i> , 2006<br>Mors <i>et al.</i> , 2000<br>Correa, 1926                                |
| <i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich ex Juss    | Malpigiaceae    | Douradinha          | Folha e casca         | Maroni <i>et al.</i> , 2006<br>Rodrigues e Carvalho, 2001<br>Almeida <i>et al.</i> , 1998<br>Cruz, 1965 |
| <i>Caesalpinia ferrea</i> L.*                  | Caesalpiniaceae | Pau-ferro           | Folha                 | Correa, 1926<br>Di Stasi, 2002  |
| <i>Hymenea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne     | Fabaceae        | Jatobá              | Folha e casca         | Maroni <i>et al.</i> , 2006<br>Lorenzi e Matos, 2002<br>Rodrigues e Carvalho, 2001<br>Agra, 1982        |

\*espécie já com estudos em andamento e que possui importante atividade inibitória da secreção de histamina

## **2. Espécies vegetais selecionadas**

### **2.1. *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze**

A família Asteraceae é constituída de 25.000 espécies distribuídas em 1.100 gêneros, constituindo assim a maior família dentre as Angiospermas. No Brasil, 180 gêneros são relatados, sendo encontrados principalmente nas regiões tropicais montanhosas (Verdi *et al.*, 2005).

*Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze é integrante da família Asteraceae, também conhecida como “a família das margaridas”. É nativa de regiões tropicais da América, mas encontrada em quase todas as partes do mundo, sendo considerada cosmopolita (Heinrich *et al.*, 2004).

Popularmente é conhecida como carrapichinho, carrapicho-rasteiro, mata-pasto, marôto, amor-de-negro, carrapicho-decarneiro, picão-da-prata, cordão-de-sapo, carrapicho-miúdo, chifrinho, pega-pega (Fig. 1). É considerada uma planta daninha, crescendo principalmente em campos e cerrados com solo de textura arenosa, em pastagens e terrenos baldios (Lorenzi, 2000; Lorenzi & Matos, 2002). Por dispersar-se facilmente, protege o solo contra erosões (Lorenzi, 2000).



**Figura 1:** *Acanthospermum australe*. Detalhe das folhas e parte reprodutiva.

Fotografia: Leonardo Noboru Seito (2011)

Seu aspecto é variado. Em geral (aproximadamente 98%) apresenta-se na forma herbácea anual, prostrada, de caules pubescentes e arroxeados, medindo de 20 a 40 cm de comprimento. A característica morfológica mais importante é a estrutura floral que está sempre reunida em inflorescências, chamadas capítulos. Suas folhas podem ser simples, inteiras ou de margens irregularmente serradas, medindo de 1,5 a 3,5 cm de comprimento. Seus frutos são providos de projeções rígidas, reproduzindo-se através de sementes (Joly, 1998; Lorenzi, 2000; Lorenzi & Matos, 2002).

Os ramos de *A. australe* são empregados na medicina tradicional brasileira, na forma de chás por infusão ou decocção, sendo utilizada como tônica, diaforética, eupéptica, vermífuga, antidiarréica, antimalárica, aromática, antiblenorrágica, febrífuga e antianêmica. É também utilizada na forma de banho,

no tratamento de dores lombares, renais ou nos membros, úlceras, feridas e micoses. O uso de *A. australe* por via oral também foi relatado no tratamento de reumatismos e artrites, asma, bronquite, além do uso externo em inchaços e hemorragias e como anti-inflamatória (Shimizu *et al.*, 1987; Araújo *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2009).

## 2.2. *Byrsonima verbascifolia* Rich ex Juss

A família Malpighiaceae é composta por aproximadamente 800 espécies distribuídas por 60 gêneros, sendo que 50% destas espécies estão concentradas no Brasil. O gênero *Byrsonima* é composto por aproximadamente 150 espécies distribuídas pelo México e América do Sul (Joly, 1998). A *Byrsonima verbascifolia* Rich ex Juss, conhecida popularmente como douradinha ou murici, é integrante da família Malpighiaceae. No Brasil, é encontrada em regiões de Cerrado e no Nordeste brasileiro (Aguiar *et al.*, 2005).

É uma planta arbórea, com 2 a 3 metros de altura por 3 a 4 metros de diâmetro de copa. Suas folhas são simples, inteiras, subsésseis, com estípulas. Possui inflorescências axilares e terminais, em racemos densos, com muitas flores de coloração amarela (Fig. 2) (Joly, 1998). Seus frutos são carnosos, com cerca de 1,3 a 1,5 cm de diâmetro, globosos, amarelos, em cachos (Di Stasi *et al.*, 2006).



**Figura 2:** *Byrsonima verbascifolia*. Detalhe das folhas e parte reprodutiva.

Fonte: <http://zoo.bio.ufpr.br/>

No uso medicinal as folhas são utilizadas como antiasmáticos, antifebris e no tratamento de infecções cutâneas. O fruto, quando ingerido com açúcar, constitui um brando laxante. A casca é utilizada no combate a febre e como adstringente. Além disso, são usadas popularmente em disfunções gástricas, picadas de cobra e ainda como antidiarréicos (Figueiredo, 2005; Caceres *et al.*, 1993; Amarquaye *et al.*, 1994).

Além do uso na medicina popular, destaca-se o emprego alimentício. O extrativismo de seus frutos contribui para a alimentação de populações locais, bem como a geração de renda. Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* são intensamente consumidas na forma de sucos, licores, geléias e doces (Alves & Franco, 2003). A espécie floresce no mês de setembro a novembro e produz de 100 a 500 frutos por planta (Silva *et al.*, 1994).

### **2.3. *Caesalpinia ferrea* L.**

A família Caesalpinaceae é uma subfamília pertencente às Leguminosae. É constituída por cerca de 160 gêneros nos quais estão distribuídos 18.000 espécies, incluindo árvores, arbustos, lianas e ervas (Di Stasi *et al.*, 2002; Joly, 1998).

São árvores de grande porte que podem chegar a 15 metros de altura. Suas folhas são bipinadas com folíolos oblongos, ovalados ou obovais. Possuem flores diclamídeas, hermafroditas com corola de 4 pétalas subiguais e uma quinta superior. A espécie é característica da mata pluvial, sendo encontrada amplamente na região amazônica e Mata Atlântica (Di Stasi *et al.*, 2002).

A espécie é denominada na região amazônica como Jucá, mais conhecida em todo o Brasil como pau-ferro ou pau-ferro verdadeiro (Fig. 3), além dos nomes indígenas ibirá-obi, imiraitá, muirá-obi e muiré-itá (Lorenzi, 1998).



**Figura 3:** *Caesalpinia ferrea*. Detalhe das folhas e parte reprodutiva.

Fonte: <http://www.mobot.org/tours/>

Várias são as utilizações medicinais dessa espécie na região amazônica. O decocto das folhas é indicado para problemas hepáticos. A infusão das folhas e frutos é útil no tratamento de inflamações, enquanto a casca é usada como antidisentérico. Na região da mata, a infusão das folhas da espécie é usada contra problemas respiratórios, especialmente bronquites (Di stasi *et al.*, 2002).

Estudos com extratos brutos de frutos e caules revelaram a presença de atividade antiúlcera (Bacchi *et al.*, 1994), anti-inflamatório (Carvalho *et al.*, 1996), e anti-histamínico (Di stasi *et al.*, 2002). Seus frutos são utilizados no tratamento de diabetes (Ueda, 2001), e na prevenção de câncer (Nakamura *et al.*, 2002).

As folhas desta espécie, na forma de decocto, são utilizadas contra hemorróidas, enquanto que o uso interno desta decocção é útil contra amebíase e problemas hepáticos, além de ser usado como fortificante para crianças. O sumo das folhas é usado internamente para problemas cardíacos. A infusão das folhas e frutos é útil para tratar inflamações do fígado e tuberculose, enquanto que a decocção da casca é usada internamente como anti-disentérico (Sanguinetti, 1989).

Na região da Mata Atlântica, a infusão das folhas da espécie é usada para problemas respiratórios, especialmente bronquites, além do uso comum contra gripes, resfriados e tosses (Di Stasi *et al.*, 2002).

Outros usos medicinais desta espécie são referidos por vários autores tais como o uso das raízes como febrífugas e antidiarreicas; do fruto com propriedades antidiabéticas; da casca como desobstruente e da madeira como anticatarral e

contra feridas. Estudos com extratos brutos dos frutos e caules de *C. ferrea* revelaram a presença de atividade antiúlcera e de restrição ao fluxo coronariano por possível ação sobre a musculatura lisa dos vasos, com alterações eletrocardiográficas secundárias. De *C. ferrea* foram ainda caracterizadas as atividades cardiotônica, antimicrobiano, analgésico e anti-inflamatório, anti-histamínico e antialérgico, anticoagulante e hepatotóxico (Di Stasi *et al.*, 2002; Bacchi, 1994; Pinto, 2000; Carvalho *et al.*, 1996).

#### **2.4. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne**

A *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) (Fig. 4), também conhecida como jatobá-do-cerrado, é uma espécie endêmica e de ampla distribuição no bioma Cerrado. É uma leguminosa arbórea pertencente à família Caesalpiniaceae que pode atingir de 3-10 m de altura e pode chegar a 50 cm de diâmetro (Rizzini, 1971).



**Figura 4:** *Hymenaea stigonocarpa*. Detalhe das folhas e parte reprodutiva.

Fonte: Leonardo Noboru Seito (2010)

Sua árvore produz frutos que variam de 10-20 cm de comprimento por 4-6 cm de largura, apresentando polpa seca, adocicada, comestível e de sabor e cheiro característicos. Suas folhas são bifoliadas, assimétricas podendo variar de acordo com a espécie dentro do mesmo gênero (Gibbs *et al.*, 1999).

A infusão de suas folhas e cascas é usada contra bronquites, enquanto que o xarope do caule é eficaz contra tosses. Seu fruto é amplamente utilizado na culinária regional. Sua polpa é consumida *in natura* e na forma de geléia, licor e farinhas para bolo, pães e mingaus. A exploração econômica do jatobá, por meio do aproveitamento de seus frutos na elaboração de produtos alimentares com valor agregado, pode representar uma alternativa de significância ecológica, econômica e social para a região dos cerrados (Navickis, 1987).



# Objetivos

Considerando-se as informações apresentadas, o presente projeto teve como objetivo realizar uma triagem preliminar *in vitro* de quatro espécies medicinais da Mata Atlântica e do Cerrado como inibidoras da secreção de histamina a partir de mastócitos, tendo em vista a seleção das espécies mais potentes para futuros estudos *in vivo*, assim como de fracionamento biomonitorado voltado para a identificação dos constituintes ativos responsáveis pela atividade detectada.



# Material e Métodos

## 1. Material Vegetal

### 1.1. Coleta do material vegetal

As plantas investigadas neste trabalho foram coletadas em áreas do Cerrado localizadas nos municípios de Botucatu-SP e Bauru-SP e em áreas de Mata Atlântica, localizadas no município de Eldorado-SP. O material florido foi coletado para a montagem de exsicatas e identificadas junto ao Herbário “Irina Delanova Gemtchujnicov” de Botucatu e da UNESP de Bauru. O tabela abaixo apresenta os dados de coleta das espécies.

Tabela II: Espécies vegetais selecionadas

| Espécie Vegetal                                 | Local de coleta | Herbário | Número de identificação |
|---|-----------------|----------|-------------------------|
| <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze  | Botucatu        | UNBA     | 5.690                   |
| <i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich ex Juss     | Botucatu        | BOTU     | 24.163                  |
| <i>Caesalpineae ferrea</i> L.                   | Eldorado        | BOTU     | 22.283                  |
| <i>Hymenocarpus stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne | Botucatu        | UNBA     | 5.691                   |

### 1.2. Obtenção dos extratos

O material vegetal foi desidratado em estufa com circulação e renovação de ar, à temperatura de 45 °C, durante 48 horas. Após a completa desidratação, o material foi pulverizado em moinhos de facas e armazenado ao abrigo de luz e umidade.

Os pós resultantes (10 g) foram submetidos à extração por maceração a frio em metanol absoluto (100 ml), durante 48 horas, por três vezes consecutivas. As soluções extrativas foram filtradas em papel de filtro, concentradas em rotaevaporador (temperatura inferior a 40 °C) e levadas à secagem completa em

estufa de ar circulante (25 °C). Os extratos obtidos foram catalogados e armazenados à 3°C para utilização posterior.

Para a realização dos ensaios de liberação de histamina, os extratos foram preparados nas concentrações de 0,3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml em solução de Tyrode e DMSO 3%. A solução de Tyrode foi preparada conforme dados da tabela III.

Tabela III. Solução Tyrode

**Solução fisiológica de Tyrode fosfato\***

|  |
|--|
| 8 g de NaCl                                |
| 0,2 g de KCl                               |
| 0,2 g CaCl <sub>2</sub>                    |
| 0,2 g de MgCl <sub>2</sub>                 |
| 0,05 g de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| 1 g de NaHCO <sub>3</sub>                  |
| 1 g de glicose                             |

(\*) As substâncias acima são adicionadas a 1 L de água destilada e carbogenizadas por aeração com mistura carbogênica (95% oxigênio 5% de dióxido de carbono) durante 10 minutos.

### 1.3. Animais

Foram utilizados ratos machos albinos Wistar, pesando entre 200 e 300 g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UNESP – Botucatu e transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências. Foram mantidos por 1 semana sob condições controladas de temperatura (20 ± 2 °C), ciclo de luminosidade de 12 h de claro e 12 h de escuro com livre acesso à água e alimentação até o momento da realização do procedimento experimental.

### 1.4. Obtenção das suspensões celulares contendo mastócitos

Para a obtenção das suspensões celulares contendo mastócitos os animais foram mortos por secção dos grandes vasos e vértebras cervicais e a pele da

região abdominal até pouco acima do processo xifóide foi removida. Após a remoção de toda a pele foram injetados 40 ml de solução tyrode (Tabela III) contendo heparina e uma lavagem direta da cavidade peritoneal foi feita. A solução foi filtrada em gaze dupla e umedecida com tyrode. Para a recuperação das células, a solução foi centrifugada a 22°C, 268.8 g por 7 minutos e lavadas 2 vezes em 12 ml de tyrode.

### **1.5. Incubações das suspensões celulares**

O volume final de suspensão foi pré-incubado à 37 °C por 5 minutos, e dividido em tubos de ensaio em alíquotas de 0,5 ml para cada amostra experimental. Em cada amostra foi adicionado um extrato, exceto em duas amostras reservadas para a dosagem de liberação espontânea de histamina, sendo que uma foi usada como controle e a outra foi utilizada para dosagem de histamina total. As amostras foram incubadas por 10 minutos para a verificação do efeito dos extratos sobre a liberação espontânea de histamina.

Apenas as espécies vegetais que não produziram liberação espontânea de histamina na ausência de compostos secretores, em uma segunda etapa, foram desafiadas com compostos secretores (ionóforo A23187 e Composto 48/80), conforme protocolo experimental descrito abaixo.

### **1.6. Soluções estoques dos agentes secretores:**

O ionóforo A23187 foi diluído em DMSO e adicionado em água destilada. Alíquotas de 1µg/ml da substância foram congeladas a -20° C para uso posterior.

O composto 48/80 foi diluído em água destilada. Para futura utilização, alíquotas de 0,5µg/mL da substância foram congeladas.

Diluições apropriadas destes compostos foram feitas através da adição de 20µl do composto secretor durante o processo de incubação celular de cada experimento.

### **1.7. Desafio das células mastocitárias**

Conforme descrito por Leung & Pearce (1984), após pré-incubação da suspensão celular por 10 minutos contendo 20 µL dos extratos vegetais, foram adicionados aos tubos de ensaio 20 µl dos agentes liberadores de secreção de mastócitos (ionóforo A23187 e composto 48/80). As amostras foram incubadas por mais 10 minutos. Após este período, foram adicionados 1 ml de tyrode à 4°C para se bloquear a reação. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 4°C, 268.8g durante 10 minutos e o sobrenadante foi separado do precipitado por decantação. Ao precipitado foi adicionado 1,5 ml de tyrode.

Por ultimo as amostras, precipitado e sobrenadante, receberam 50 µL de ácido perclórico 11.6 N (concentração final de 0,4 N) para precipitação das proteínas e rompimento completo das células. A extração e dosagem automática de histamina foi feita através de método fluorimétrico caracterizado por Shore *et al.* (1959).

## **2. Extração e dosagem automática de histamina**

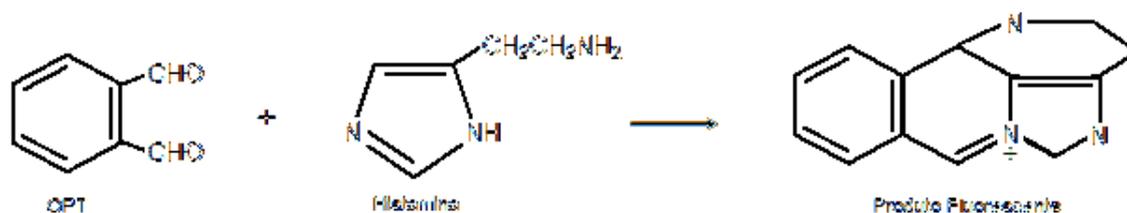
Para a extração e dosagem automática de histamina foi utilizado o método fluorimétrico de Shore *et al.* (1959), realizado por meio de um sistema de fluxo contínuo modular automático (Siraganian, 1974).

Esta técnica foi desenvolvida durante a década de 50 formando a base de todos os sistemas de análises por fluxo contínuo. Amostras e reagentes,

segmentados por bolhas de ar, são aspirados mediante uma bomba continua e precisa que distribue o volume exato de amostra assim como a mistura de diferentes fluidos para a análise. As amostras passam por um sistema de tubos e são conduzidas através de reagentes, controladas por condições que causam reações químicas quantitativamente calculadas. O fluxo é direcionado através dos tubos, módulo por módulo. Cada unidade possui uma função analítica diferente, incluindo distribuição de amostras e reagentes, purificação e filtração, aquecimento e incubação, detecção e registro.

Resumidamente, as amostras contendo histamina foram submetidas à extração butanólica após adição de NaOH 2 N saturado com NaCl, formando duas fases: aquosa e orgânica. A fase aquosa foi desprezada e à fase orgânica se adicionou NaOH 0.1 N saturado com NaCl para remover resíduos orgânicos, formando novamente uma fase orgânica e outra aquosa, esta última novamente desprezada. Foi adicionado HCl 0.1 N na fase orgânica para a extração da histamina. Após este procedimento, a fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa ácida contendo histamina foi utilizada nos procedimentos seguintes. Nesta fase a histamina foi submetida à condensação com ortoftaldialdeído (OPT) em solução fortemente alcalina (Fig. 11). Se obtém desta forma um produto fluorescente, estabilizado por acidificação com HCl 3 N. A intensidade de fluorescência foi registrada em papel na forma de picos, medidos para o cálculo de porcentagens de histamina liberada.

Figura 5: Condensação da histamina com o OPT.



### 3. Apresentação dos resultados

#### 3.1. Cálculo da liberação de histamina:

Os resultados foram apresentados na forma de porcentagem de histamina liberada, conforme cálculo descrito abaixo:

$$\% \text{ Liberação de Histamina} = \frac{\text{Sobrenadante} \times 100}{\text{Sobrenadante} + \text{Precipitado}}$$

#### 3.2. Cálculo da inibição de histamina

Em Complemento aos resultados, foi calculada a porcentagem de inibição de histamina, visando maior clareza para observação dos dados.

$$\% \text{ Inibição de Histamina} = \frac{\% \text{ Liberação} \times 100}{\% \text{ Liberação induzida pelo composto secretor}} - (100)$$

#### **4. Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos em termos de porcentagem de histamina liberada, sob forma de média, acompanhada por seus respectivos erros padrão (EPM).

As análises foram feitas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste paramétrico de Dunnett. Foram consideradas como verdadeira as diferenças de médias cuja probabilidade de erro foram menores que 5%.

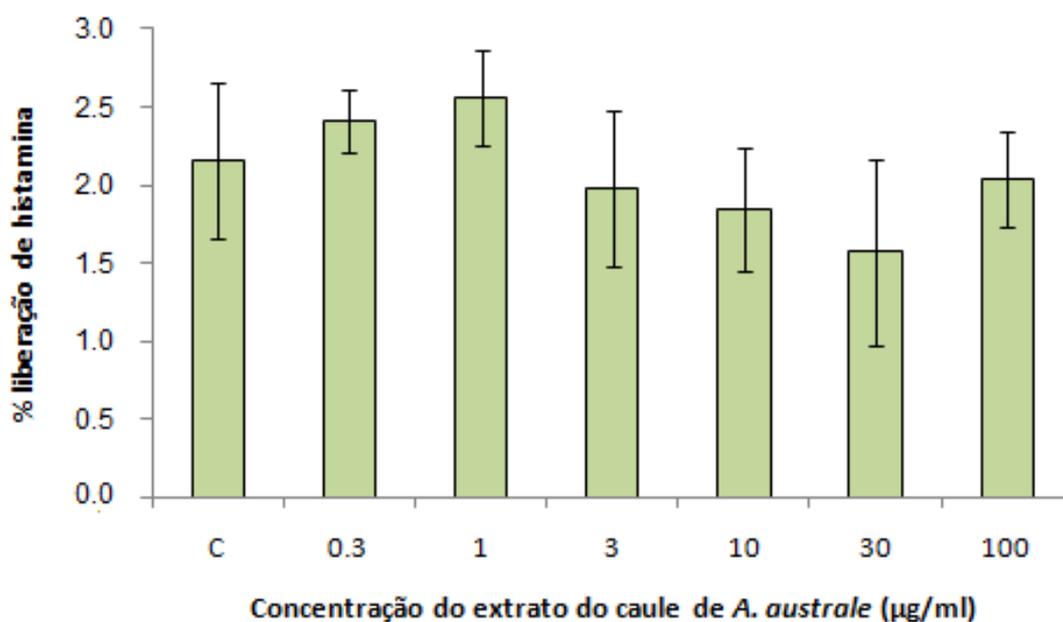


**Resultados**

## 1. *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze

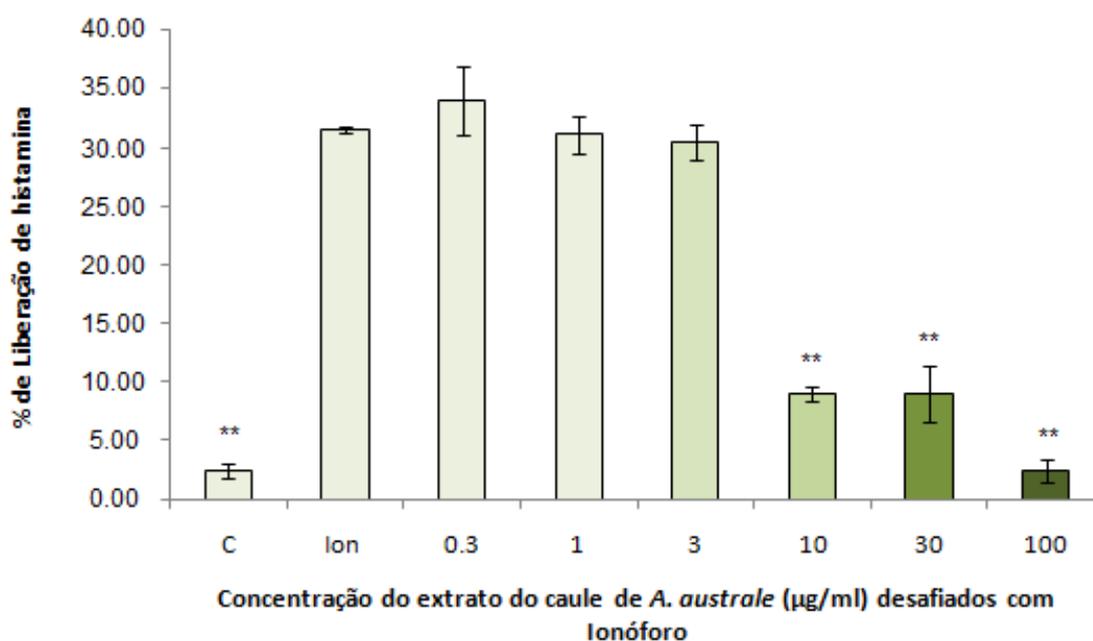
### 1.1. Caule

As concentrações do extrato metanólico do caule da *A. australe*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37°C com concentrações de 0.3, 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações do caule da *A. australe* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 7).



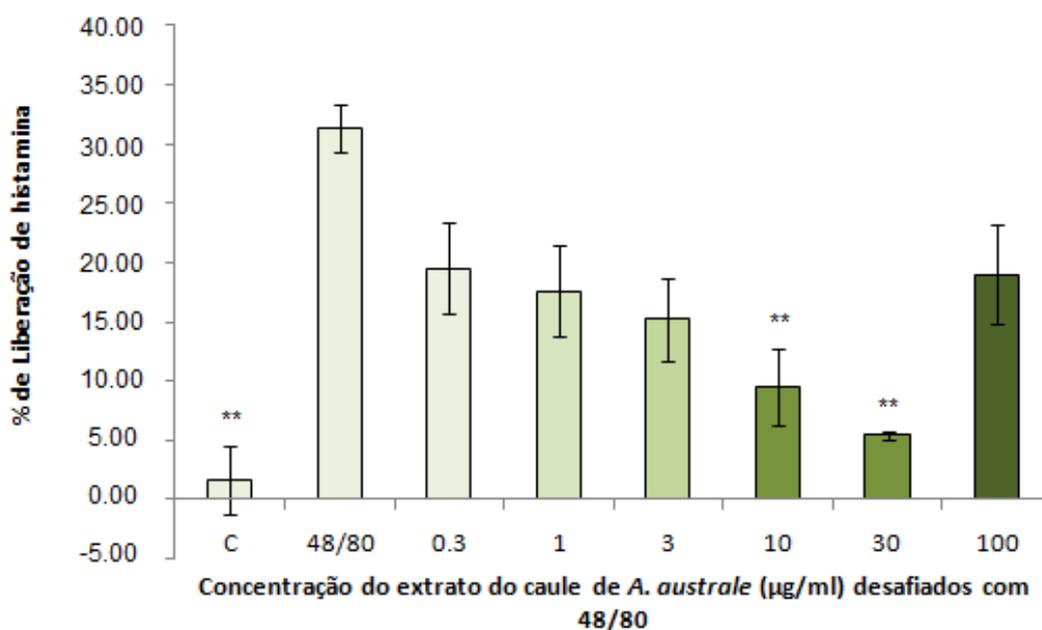
**Figura 6:** Efeitos do extrato do caule da *Acanthospermum australe* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se que as concentrações de 10, 30 e 100 µg/ml do extrato de caule de *A. australe* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 8), respectivamente em 71.35; 71.43 e 91.91% (Tabela IV).



**Figura 7:** Efeitos do extrato do caule de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo lon). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20  $\mu$ l do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que apenas as concentrações de 10 e 30  $\mu$ g/ml do extrato de caule de *A. australe* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 9), respectivamente em 69.6 e 82.7% (Tabela IV).



**Figura 8:** Efeitos do extrato do caule de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento)

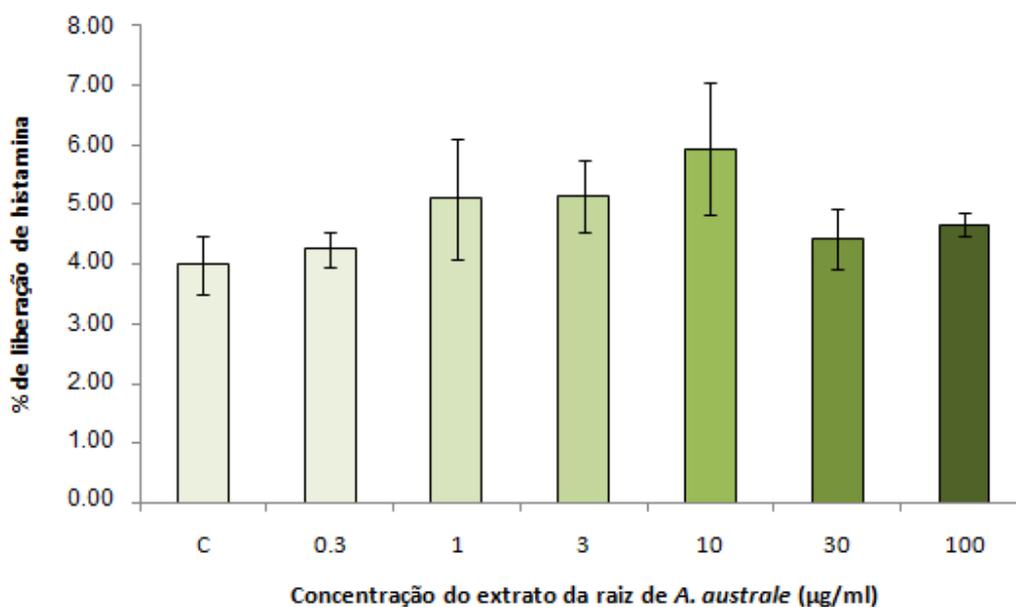
Na Tabela IV, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato de caule de *A. australe* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

**Tabela IV:** Efeito inibitório dos extratos do caule de *A. australe* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo A23187                          | 48/80                                       |
|---------------|--|---|
|               | % inibição de Histamina<br>(média ± EPM) | % de inibição de Histamina<br>(média ± EPM) |
| 0,3 µg/ml     | 0.0 ± 2.9                                | 37.6 ± 3.8                                  |
| 1 µg/ml       | 1.36 ± 1.6                               | 43.6 ± 3.9                                  |
| 3 µg/ml       | 3.33 ± 1.5                               | 51.4 ± 3.5                                  |
| 10 µg/ml      | 71.35 ± 0.6                              | 69.6 ± 3.2                                  |
| 30 µg/ml      | 71.43 ± 2.4                              | 82.7 ± 0.4                                  |
| 100 µg/ml     | 91.91 ± 1                                | 39.2 ± 4.2                                  |

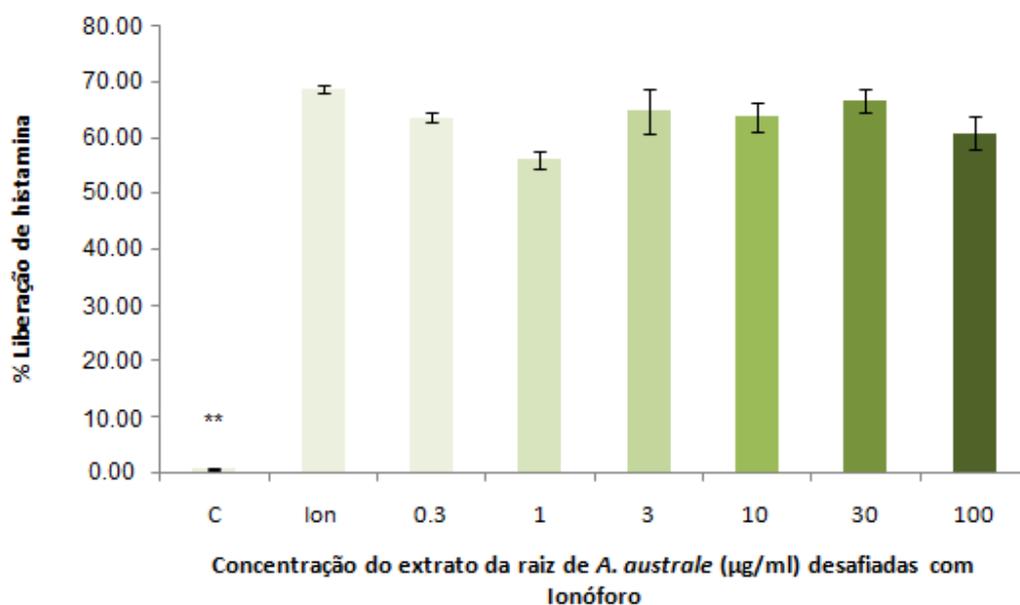
## 1.2. Raiz

As concentrações do extrato metanólico da raiz de *A. australe*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37° com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações da raiz de *A. australe* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhantes ao controle (Figura 10).



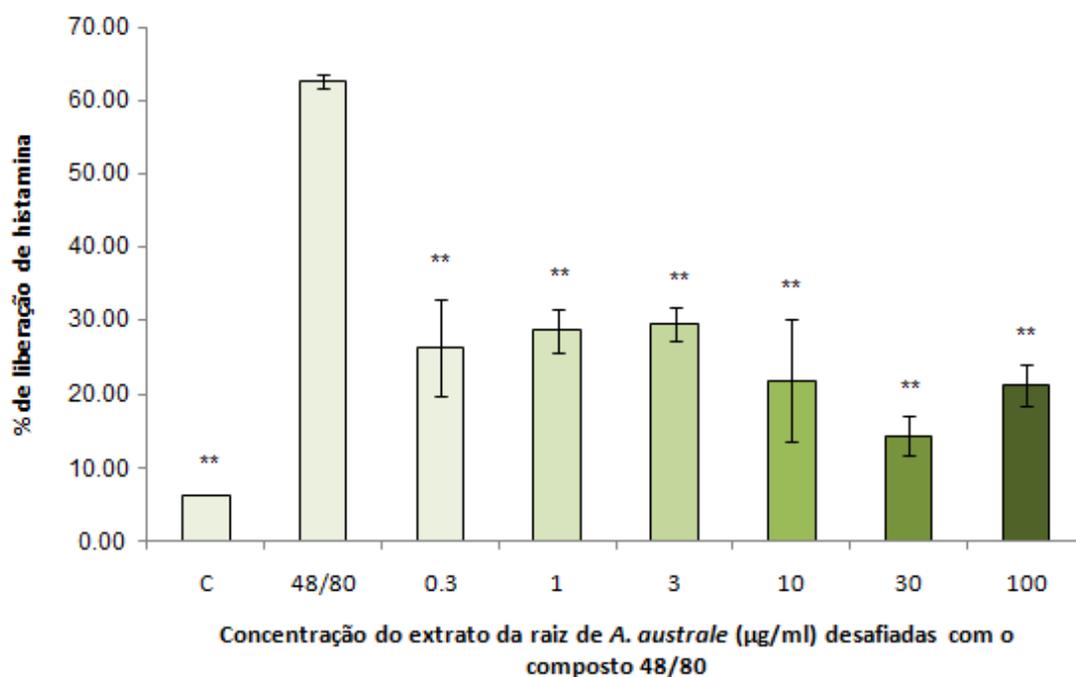
**Figura 9:** Efeitos do extrato da raiz de *A. australe* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se que os extratos da raiz de *A. australe* nas concentrações testadas (0,3; 1, 3,10, 30 e 100 µg/ml) não promoveram redução significativa (Tabela V) sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 11).



**Figura 10:** Efeitos do extrato da raiz de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo lon). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20  $\mu$ l do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 0.3; 1, 3, 10, 30 e 100  $\mu$ g/ml do extrato da raiz de *A. australe* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 12), respectivamente em 58.1; 54.3; 52.9; 65.2; 61.5 e 66.2% (Tabela V).



**Figura 11:** Efeitos do extrato da raiz de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

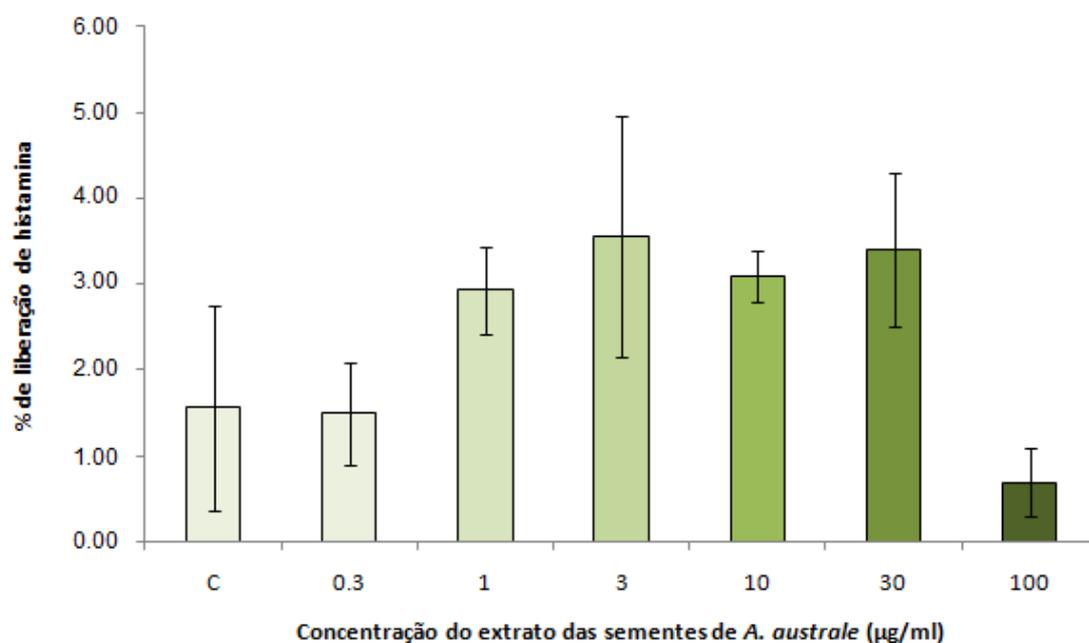
Na Tabela V, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato da raiz de *A. australe* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

**Tabela V:** Efeito inibitório dos extratos da raiz de *Acanthospemum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                                 | 48/80                                    |
|---------------|--|--|
|               | % inibição de Histamina<br>(média ± EPM) | % inibição de Histamina<br>(média ± EPM) |
| 0,3           | 7.46 ± 1                                 | 58.1 ± 6.5                               |
| 1             | 18.47 ± 1.5                              | 54.3 ± 3                                 |
| 3             | 7.26 ± 4                                 | 52.9 ± 2.3                               |
| 10            | 5.69 ± 2.6                               | 65.2 ± 8.4                               |
| 30            | 2.89 ± 2.1                               | 61.5 ± 2.6                               |
| 100           | 11.48 ± 3                                | 66.2 ± 2.8                               |

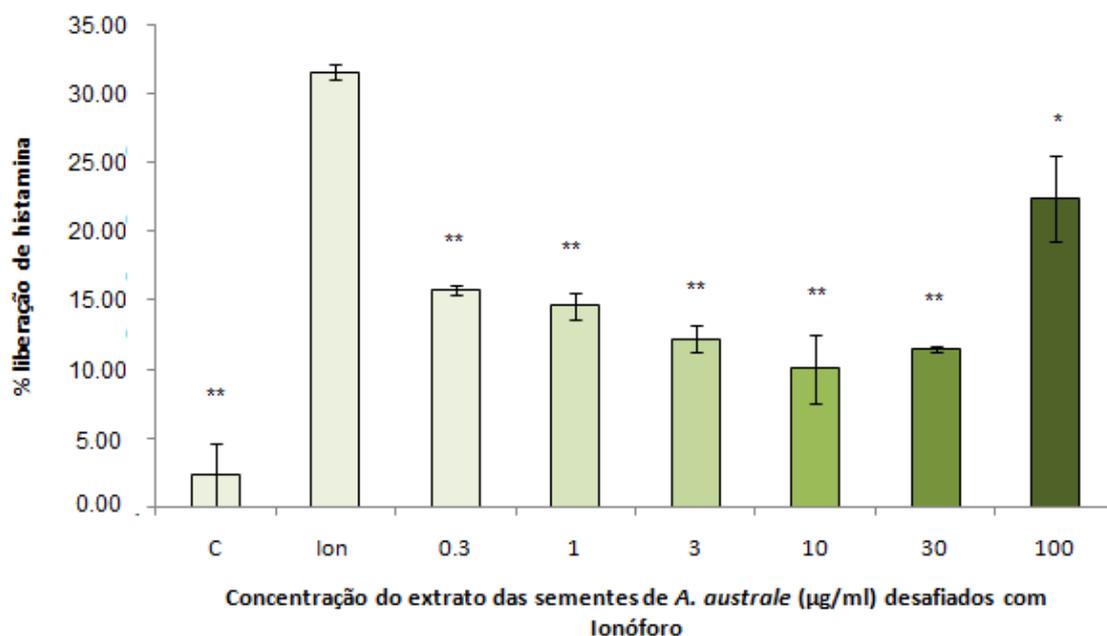
## 1.1. Semente

As concentrações do extrato metanólico das sementes da *A. australe*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37° com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações das sementes de *A. australe* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 13).



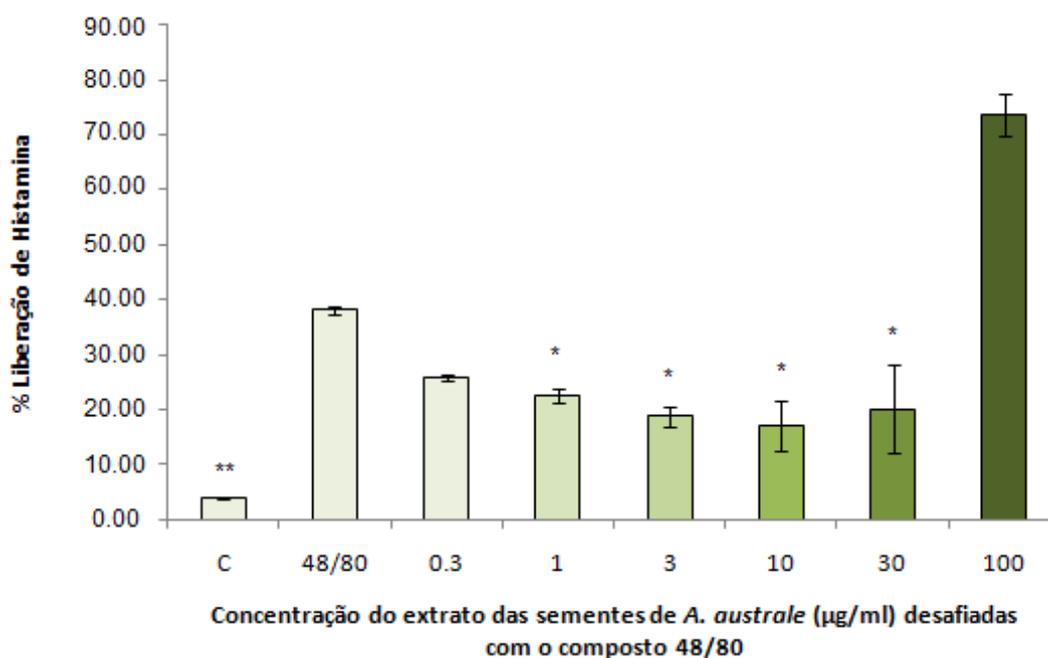
**Figura 12:** Efeitos do extrato das sementes de *Acanthospermum australe* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se que as concentrações de 0.3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato das sementes de *A. australe* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 14), respectivamente em 50.18; 46.20; 38.52; 68.39; 63.62 e 29.14% (Tabela VI).



**Figura 13:** Efeitos do extrato das sementes de *A. australe* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo lon). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 1, 3, 10 e 30 µg/ml do extrato das sementes de *A. australe* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 15), respectivamente em 40; 50.64; 55.10 e 47.14% (Tabela VI).



**Figura 14:** Efeitos do extrato das sementes de *Acanthospermum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

Na Tabela VI, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato das sementes de *A. australe* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

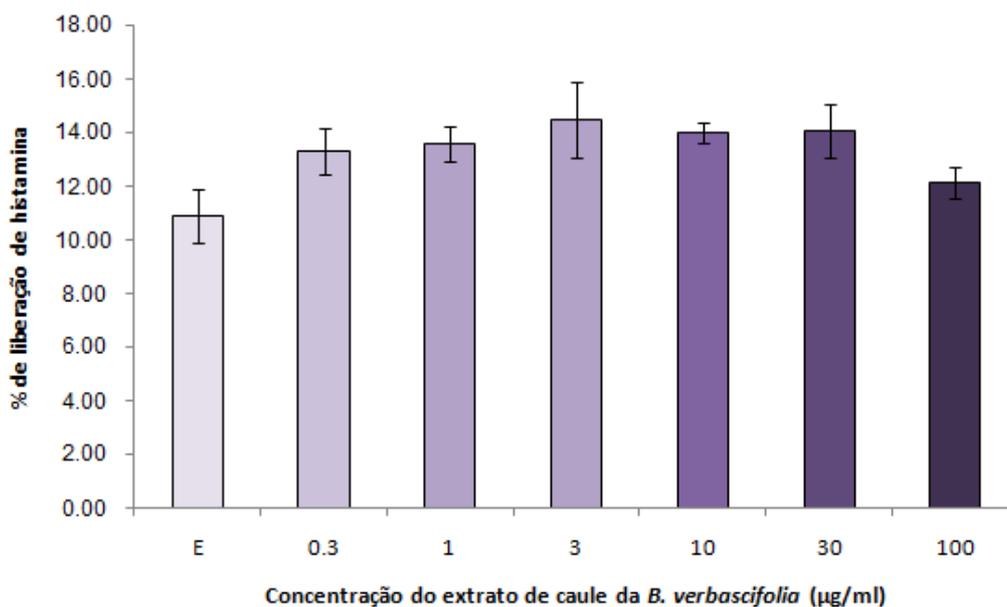
**Tabela VI:** Efeito inibitório dos extratos da semente de *Acanthospemum australe* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                                 | 48/80                                    |
|---------------|--|--|
|               | % inibição de Histamina<br>(média ± EPM) | % inibição de Histamina<br>(média ± EPM) |
| 0,3           | 50.18 ± 0.4                              | 32.01 ± 0.6                              |
| 1             | 46.20 ± 1                                | 40.00 ± 1.3                              |
| 3             | 38.52 ± 1                                | 50.64 ± 1.9                              |
| 10            | 68.39 ± 2.5                              | 55.10 ± 4.7                              |
| 30            | 63.62 ± 0.2                              | 47.14 ± 7.9                              |
| 100           | 29.14 ± 3.1                              | 0 ± 3.9                                  |

## 2. *Byrsonima Verbascifolia* Rich ex Juss

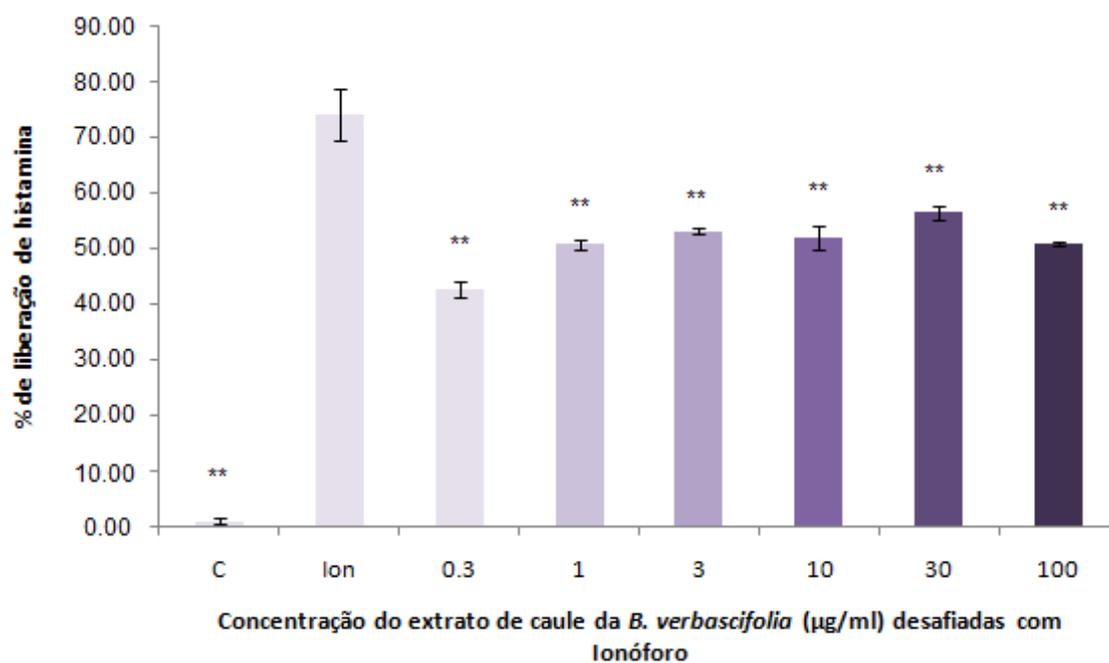
### 2.1. Caule

As concentrações do extrato metanólico do caule de *Byrsonima verbascifolia*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37 °C com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações do caule de *B. verbascifolia* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 16).



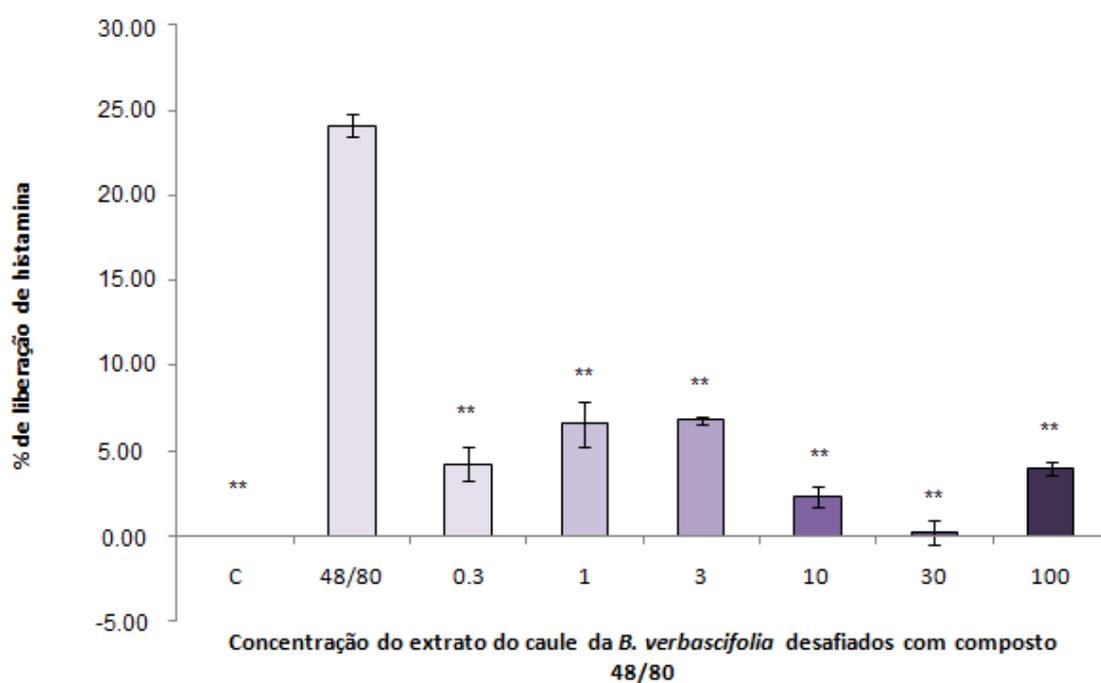
**Figura 15:** Efeitos do extrato do caule de *B. verbascifolia* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se que as concentrações de 0.3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato do caule de *B. verbascifolia* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 17), respectivamente em 42.50; 31.58; 28.33; 29.96; 23.81 e 31.29% (Tabela VII).



**Figura 16:** Efeitos do extrato do caule de *B. verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo Ion). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 0.3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato do caule de *B. verbascifolia* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 18), respectivamente em 72.4; 72.8; 74.48; 86.0; 90.12 e 88.8% (Tabela VII).



**Figura 17:** Efeitos do extrato do caule de *B. verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

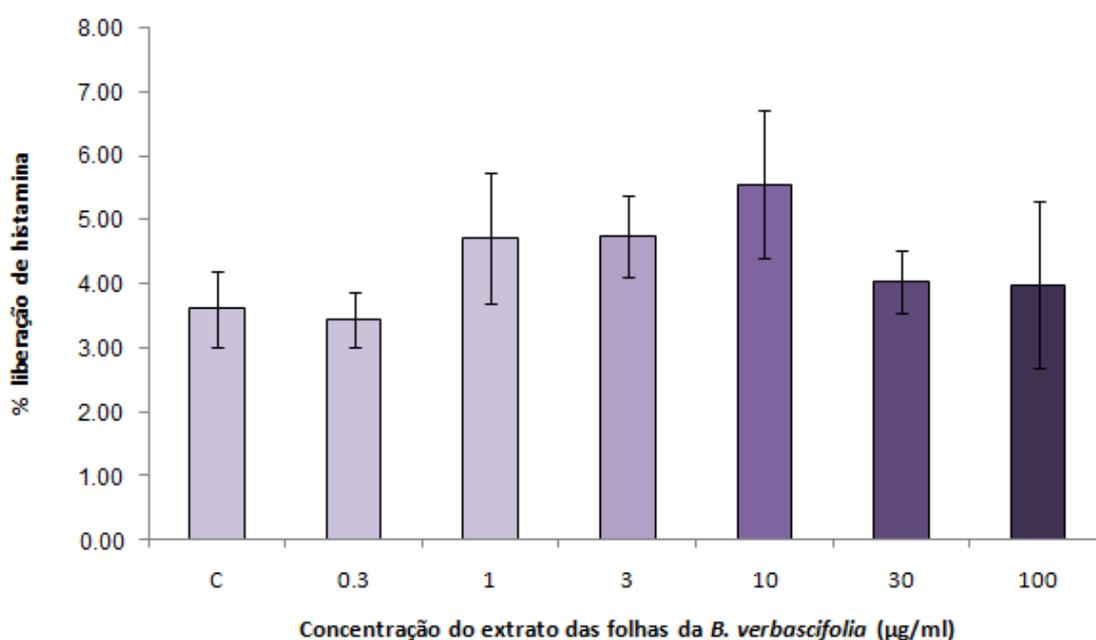
Na Tabela VII, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato do caule de *B.verbascifolia* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

**Tabela VII:** Efeito inibitório dos extratos do caule de *B. verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                                 | 48/80                                       |
|---------------|--|---|
|               | % inibição de Histamina<br>(média ± EPM) | % de inibição de Histamina<br>(média ± EPM) |
| 0,3           | 42.50 ± 1.8                              | 72.4 ± 1                                    |
| 1             | 31.58 ± 0.9                              | 72.8 ± 1.3                                  |
| 3             | 28.33 ± 0.6                              | 74.48 ± 0.2                                 |
| 10            | 2.96 ± 2                                 | 86.0 ± 0.6                                  |
| 30            | 23.81 ± 1.2                              | 90.12 ± 0.7                                 |
| 100           | 31.29 ± 0.3                              | 88.8 ± 0.4                                  |

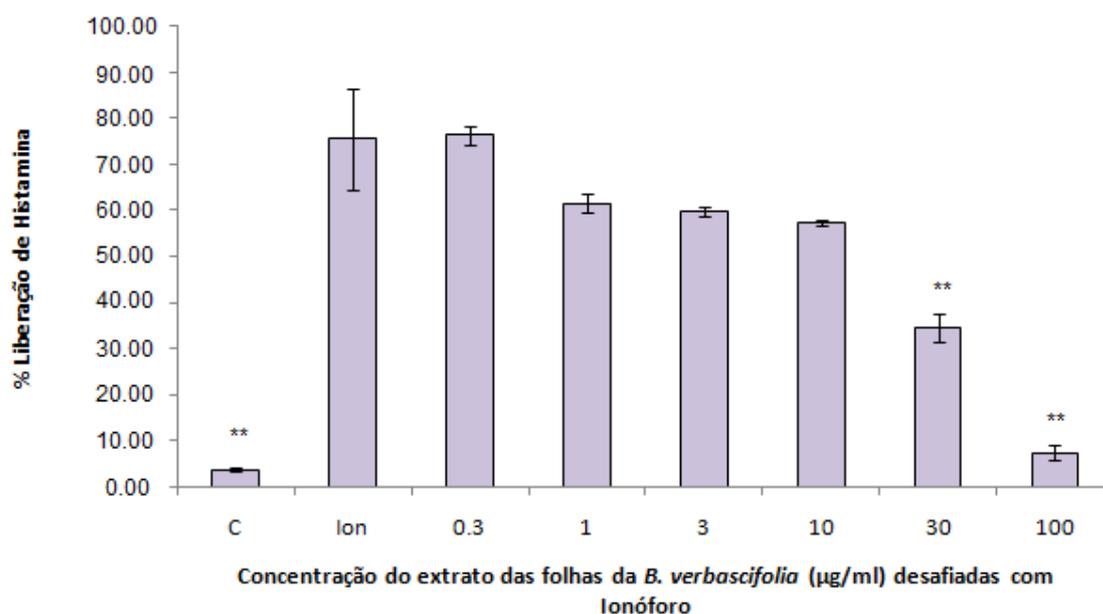
## 2.2. Folhas

As concentrações do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima verbascifolia*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37° com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações das folhas de *B. verbascifolia* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 19).



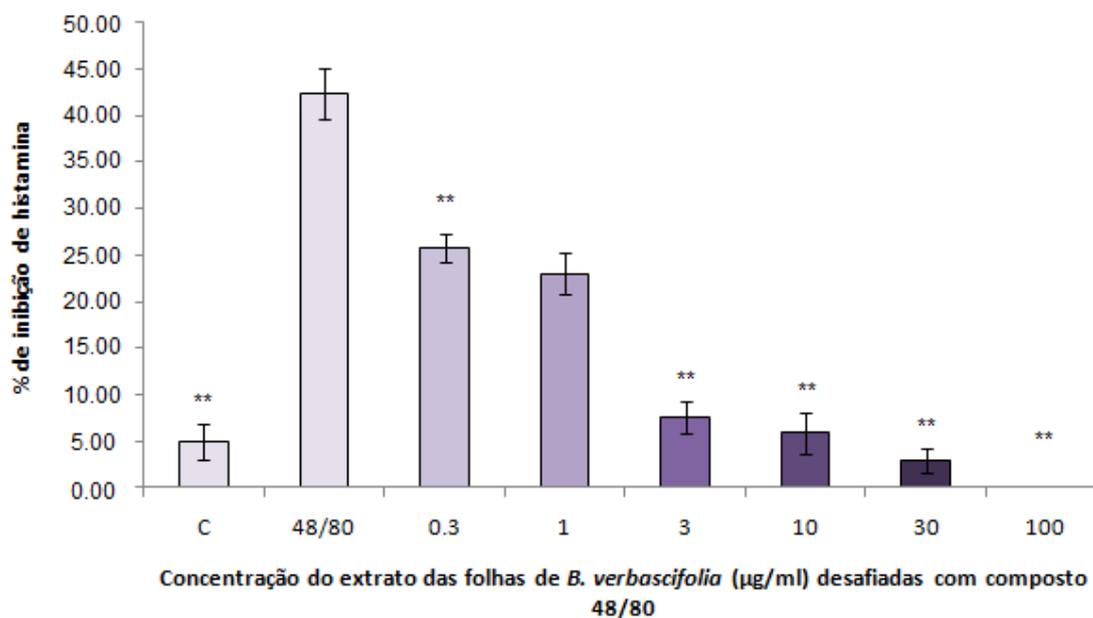
**Figura 18:** Efeitos do extrato das folhas de *B. verbascifolia* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se que apenas as concentrações de 30 e 100 µg/ml do extrato das folhas de *B. verbascifolia* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 20), respectivamente em 54.34 e 90.38% (Tabela VIII).



**Figura 19:** Efeitos do extrato das folhas de *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida por Ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo Ion). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 0,3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato das folhas de *B. verbascifolia* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 21), respectivamente em 39.1; 45.8; 82; 86; 93.2 e 100% (Tabela VIII).



**Figura 20:** Efeitos do extrato das folhas de *B. verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

Na Tabela VIII, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato das folhas da *B.verbascifolia* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

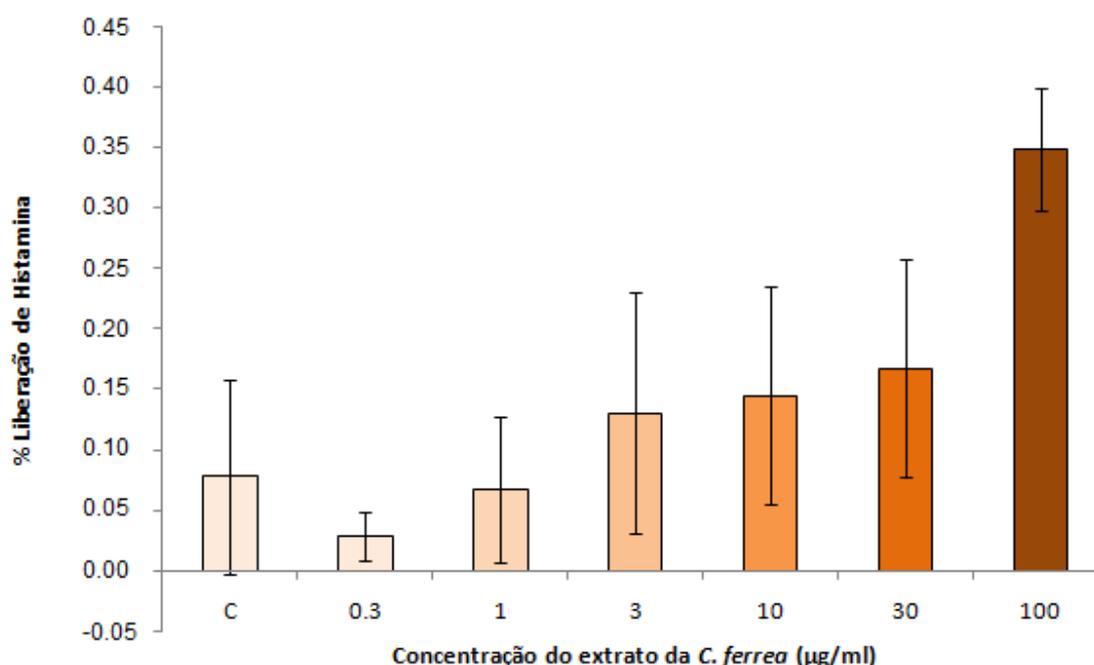
**Tabela VIII:** Efeito inibitório dos extratos das folhas da *Byrsonima verbascifolia* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                              | 48/80                                    |
|---------------|---------------------------------------|--|
|               | % inibição de Histamina (média ± EPM) | % de inibição de Histamina (média ± EPM) |
| 0,3           | 0 ± 1.8                               | 39.1 ± 1                                 |
| 1             | 18.47 ± 0.9                           | 45.8 ± 1.3                               |
| 3             | 20.78 ± 0.6                           | 82 ± 0.2                                 |
| 10            | 24 ± 2                                | 86 ± 0.6                                 |
| 30            | 54.34 ± 1.2                           | 93.2 ± 0.7                               |
| 100           | 90.38 ± 0.3                           | 100 ± 0.4                                |

### 3. *Caesalpinia ferrea* L.

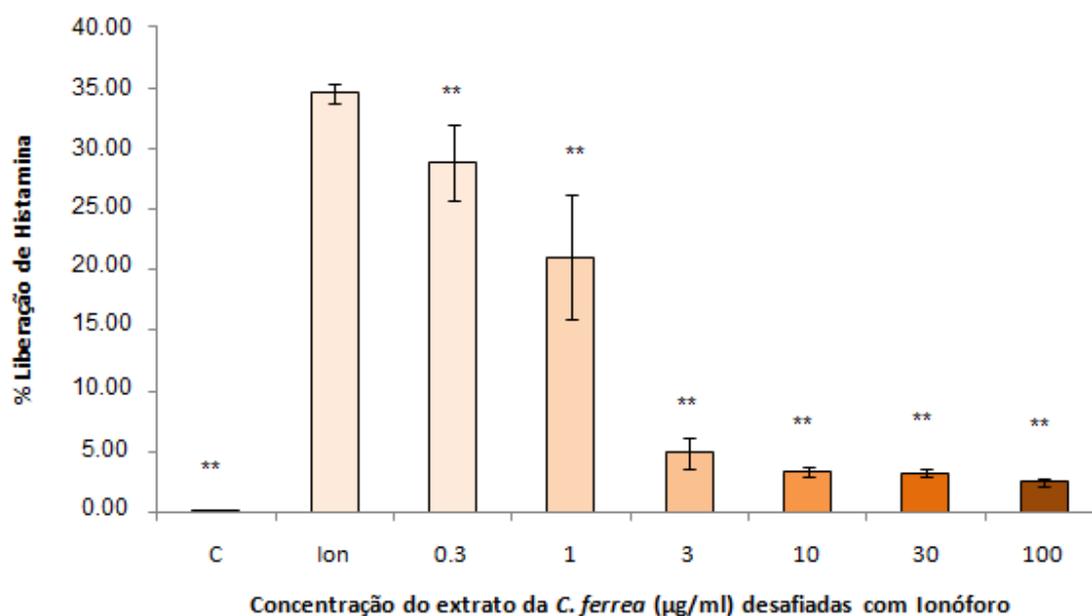
#### 3.1. Folhas

As concentrações do extrato metanólico das folhas de *C. ferrea*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37° com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações das folhas de *C. ferrea* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 22).



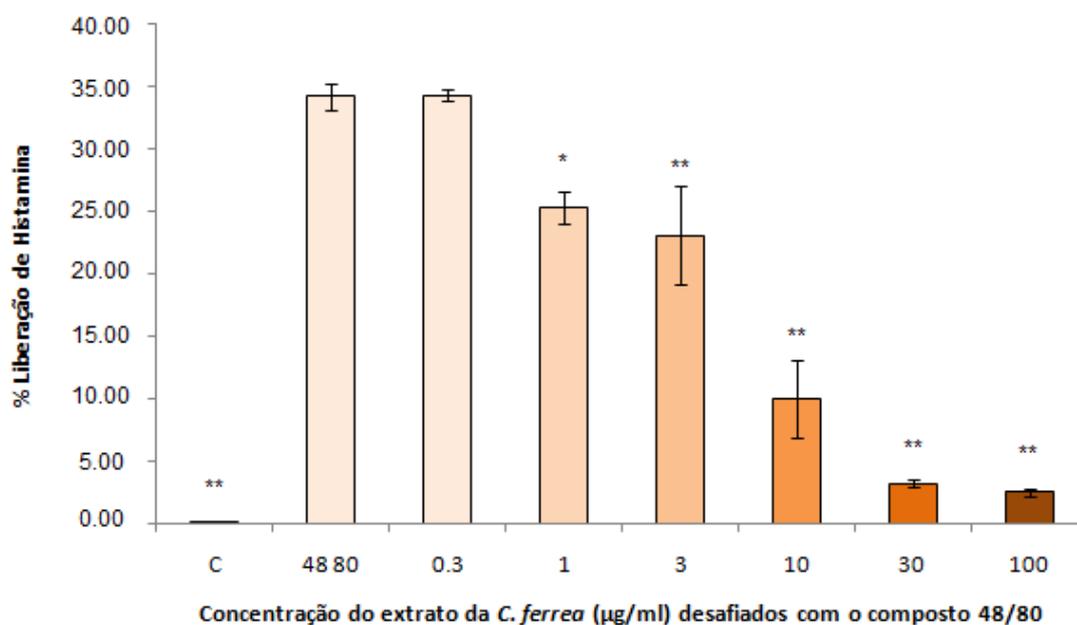
**Figura 21:** Efeitos do extrato do caule de *C. ferrea* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se as concentrações de 0,3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato das folhas de *C. ferrea* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 23), respectivamente em 16.59; 39.10; 85.78; 90.27; 90.70 e 92.77% (Tabela IX).



**Figura 22:** Efeitos do extrato das folhas de *C. ferrea* sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo Ion). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato das folhas de *C. ferrea* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 24), respectivamente em 26.09; 32.42; 70.92; 90.59 e 92.67% (Tabela IX).



**Figura 23:** Efeitos do extrato das folhas de *Caesalpinia ferrea* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

Na Tabela IX, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato das folhas de *C. ferrea* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

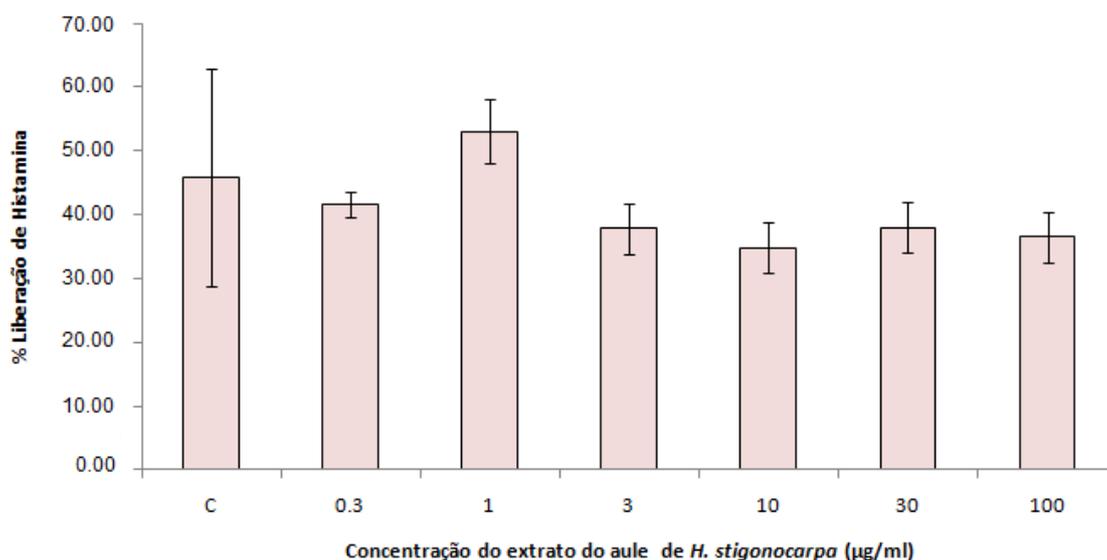
**Tabela IX:** Efeito inibitório dos extratos das folhas da *Caesalpinia ferrea* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                              | 48/80                                    |
|---------------|---------------------------------------|--|
|               | % inibição de Histamina (média ± EPM) | % de inibição de Histamina (média ± EPM) |
| 0,3           | 16.59 ± 3.1                           | 0.32 ± 0.5                               |
| 1             | 39.10 ± 5.2                           | 26.09 ± 1.3                              |
| 3             | 85.78 ± 1.3                           | 32.42 ± 3.9                              |
| 10            | 90.27 ± 0.4                           | 70.92 ± 3.1                              |
| 30            | 90.70 ± 0.3                           | 90.59 ± 0.3                              |
| 100           | 92.77 ± 0.3                           | 92.67 ± 0.3                              |

## 4. *Hymeneae stigonocarpa* Mart. ex Hayne

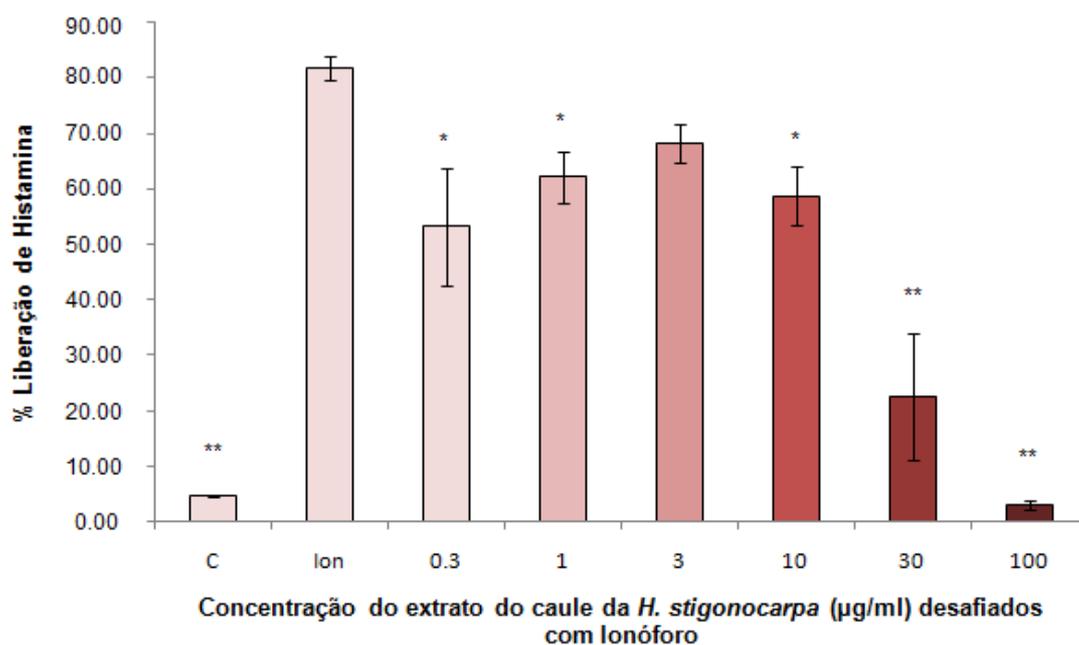
### 4.1. Caule

As concentrações do extrato metanólico do caule de *Hymeneae stigonocarpa*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37° com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações do caule de *H. stigonocarpa* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 25).



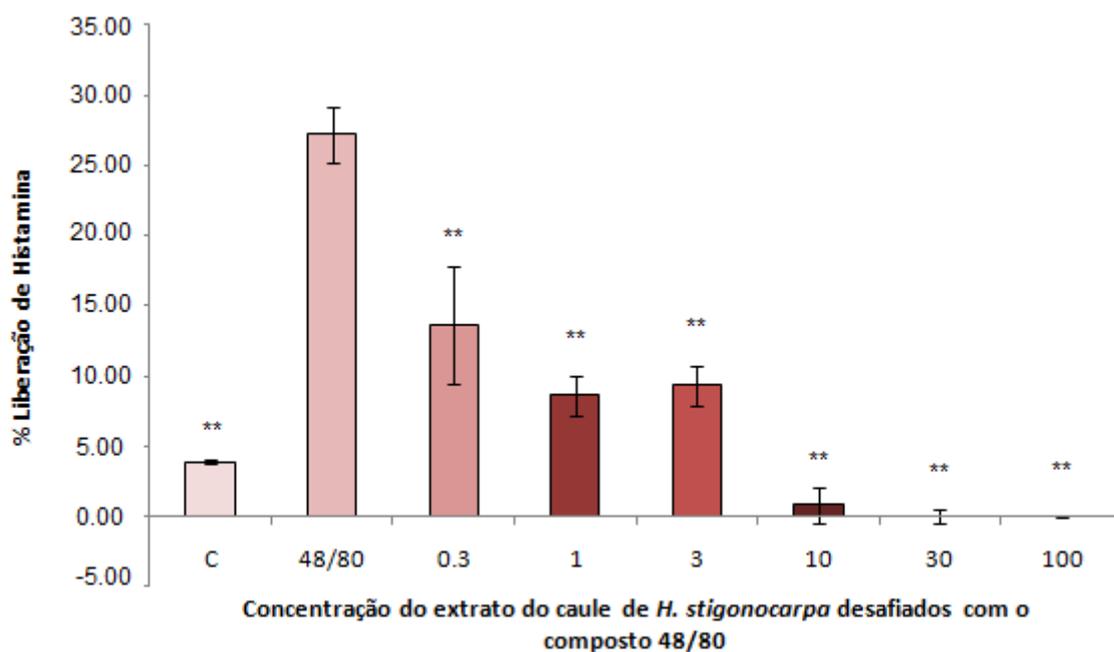
**Figura 24:** Efeitos do extrato do caule de *H. stigonocarpa* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se as concentrações de 0.3, 1, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato do caule de *H. stigonocarpa* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 26), respectivamente em 34.90; 24; 28.26; 72.47 e 96.45% (Tabela X).



**Figura 25:** Efeitos do extrato do caule de *H. stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo Ion). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 0,3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato do caule de *H. stigonocarpa* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 27), respectivamente em 79,20; 81,68; 83,64; 100, 100 e 100% (Tabela X).



**Figura 26:** Efeitos do extrato do caule da *H. stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

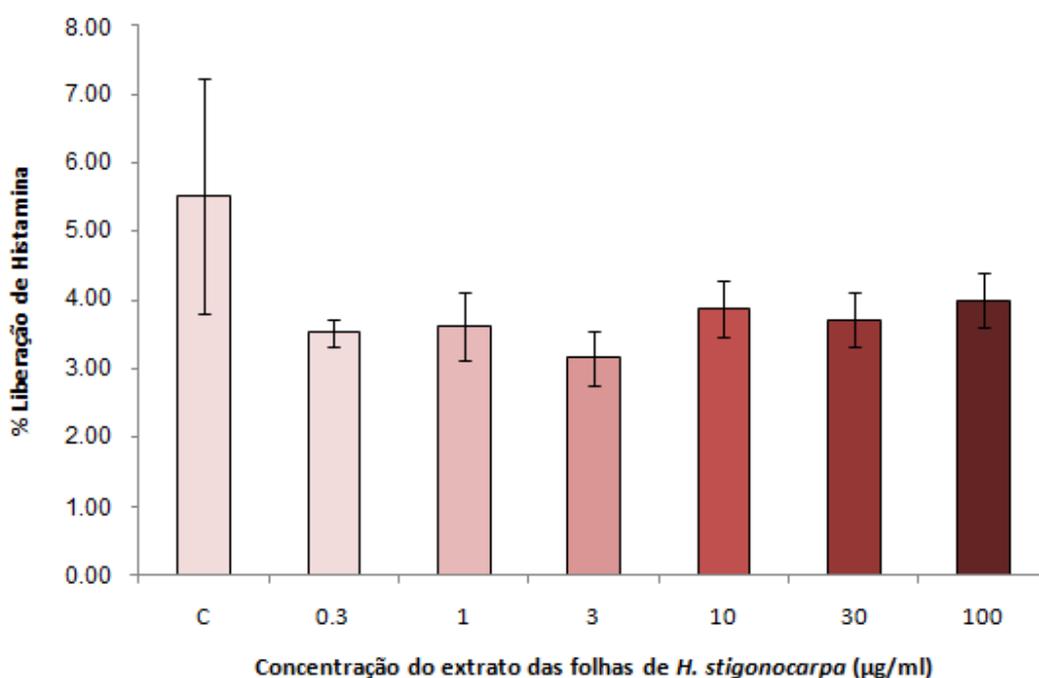
Na Tabela X, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato do caule de *H. stigonocarpa* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

**Tabela X:** Efeito inibitório dos extratos do caule da *Hymeneae stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                | 48/80                      |
|---------------|-------------------------|----------------------------|
|               | % inibição de Histamina | % de inibição de Histamina |
| <b>0,3</b>    | 34.98 ± 10.5            | 79.20 ± 4.2                |
| <b>1</b>      | 24.11 ± 4.7             | 81.68 ± 1.4                |
| <b>3</b>      | 16.76 ± 3.5             | 83.64 ± 1.4                |
| <b>10</b>     | 28.26 ± 5.4             | 100 ± 1.3                  |
| <b>30</b>     | 72.47 ± 11.3            | 100 ± 0.5                  |
| <b>100</b>    | 96.45 ± 0.8             | 100 ± 1.0                  |

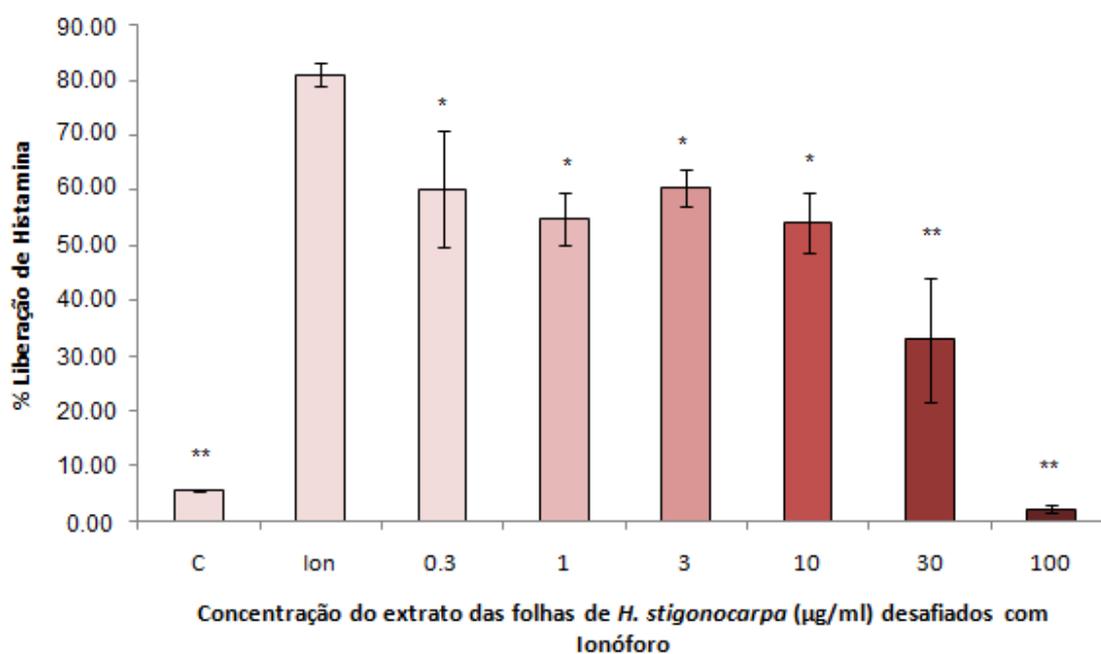
## 4.2. Folha

As concentrações do extrato metanólico das folhas de *H. stigonocarpa*, foram inicialmente testadas na ausência de compostos secretores, com a finalidade de observar a capacidade da espécie de interferir ou não na liberação espontânea de histamina. As células foram encubadas na temperatura de 37°C com concentrações de 0.3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/ml do extrato. O controle utilizado é composto apenas pelas células, sem nenhum tratamento ou composto secretor. Todas as concentrações das folhas de *H. stigonocarpa* induziram uma liberação espontânea de histamina semelhante ao controle (Figura 28).



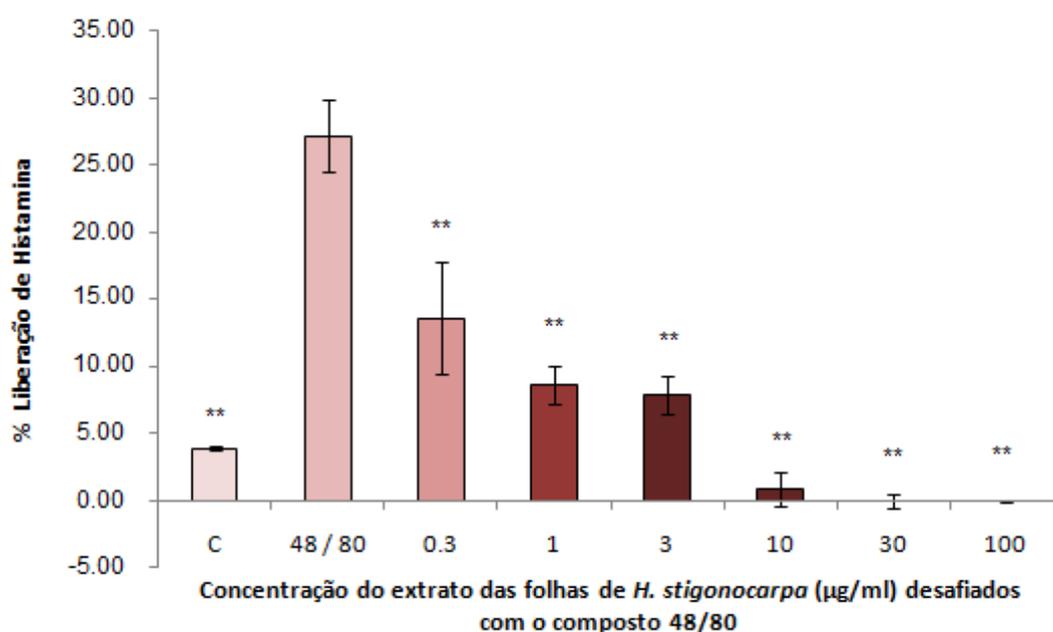
**Figura 27:** Efeitos do extrato das folhas de *H. stigonocarpa* nas concentrações 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/ml sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos. Os dados são expressos em média ± EPM. C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (ionóforo A23187) verificou-se as concentrações de 0.3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato das folhas de *H. stigonocarpa* reduziram significativamente a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187 (Figura 29), respectivamente em 25.59; 32.38; 25.33; 33.23; 59.49 e 97.40% (Tabela XI).



**Figura 28:** Efeitos do extrato das folhas de *H. stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida por ionóforo A23187. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo lon). C: controle (células sem tratamento).

Após o tratamento das células com 20 µl do composto secretor (Composto 48/80) verificou-se que as concentrações de 0.3; 1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml do extrato das folhas de *H. stigonocarpa* foram capazes de reduzir significativamente a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 30), respectivamente em 49.92; 68.39; 65.67; 96.94; 100 e 100% (Tabela XI).



**Figura 29:** Efeitos do extrato das folhas de *Hymeneae stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80. Os dados são expressos em média ± EPM. (\*\*p<0,01 em relação ao grupo 48/80). C: controle (células sem tratamento).

Na Tabela XI, pode-se ainda observar individualmente as porcentagens de inibição da liberação de histamina produzidas pelo extrato das folhas de *H. stigonocarpa* após indução da liberação pelos compostos ionóforo A23187 e composto 48/80.

**Tabela XI:** Efeito inibitório dos extratos das folhas da *Hymeneae stigonocarpa* sobre a liberação de histamina induzida pelos compostos secretores:

| Concentrações | Ionóforo                | 48/80                      |
|---------------|-------------------------|----------------------------|
|               | % inibição de Histamina | % de inibição de Histamina |
| 0,3           | 25.59 ± 10.5            | 49.92 ± 4.2                |
| 1             | 32.38 ± 0.7             | 68.39 ± 1.4                |
| 3             | 25.33 ± 1.7             | 65.67 ± 1.4                |
| 10            | 33.23 ± 5.4             | 96.94 ± 1.3                |
| 30            | 59.49 ± 10.3            | 100 ± 0.5                  |
| 100           | 97.40 ± 0.8             | 100 ± 0.08                 |



## Discussão

As espécies vegetais estudadas foram selecionadas com base em dados etnofarmacológicos e seus efeitos estudados em modelos experimentais *in vitro*, os quais permitem a determinação de uma atividade biológica diretamente na célula alvo, neste caso os mastócitos retirados da cavidade peritoneal de ratos. De acordo com a tradição de uso de plantas medicinais na forma de infusões, decocções e outros macerados vegetais de distinta origem e produção, a via de administração invariavelmente é a oral, de modo que um extrato ativo por esta via justificaria o uso popular e tradicional, enquanto que a ausência de efeitos poderia ser interpretada ou pela ausência de substância ativa nos extratos ou não absorção pelo trato gastrointestinal. No entanto, mesmo considerando a limitação dos ensaios *in vitro* para efetivamente se justificar o uso popular, tais modelos experimentais permitem a análise de um grande número de amostras em pequenas concentrações, portanto de fácil obtenção e estudo, sendo útil no processo de triagem de plantas com finalidade de seleção das mais ativas para estudos mais detalhados. Neste sentido, o presente estudo tem sua relevância principal em realizar uma triagem preliminar de produtos de origem vegetal com a finalidade de identificar potenciais espécies vegetais a serem estudadas em modelos *in vivo*, assim como em estudos de prospecção dos constituintes químicos responsáveis por esta atividade, como foi proposto por Di Stasi *et al.*, 1999.

Desta forma, quatro diferentes espécies medicinais de amplo uso popular e tradicional foram selecionadas para esta triagem, que envolveu a análise de 8 diferentes extratos obtidos de distintas partes das plantas selecionadas. Os 8 extratos vegetais foram estudados em duas diferentes abordagens metodológicas, a primeira verificando-se a influência de cada extrato sobre a liberação espontânea de histamina a partir de mastócitos e a segunda, verificando-se a capacidade destes extratos de reduzirem a liberação de histamina, após os mastócitos serem estimulados com dois diferentes agentes secretagogos, o ionóforo A23187 e o composto 48/80, que liberam a histamina dos mastócitos por diferentes mecanismos, de forma não citotóxica, mas interferindo com a mobilização de  $Ca^{2+}$  (Gomes *et al.*, 1994).

As espécies testadas são utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de diferentes processos alérgicos como afecções cutâneas e asma (Lorenzi e Matos, 2002; Di Stasi *et al.*, 2002). Estudos realizados com estas espécies demonstraram que elas apresentam diversas atividades farmacológicas associadas a processos alérgicos (Carvalho *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1987; Ueda *et al.*, 2001; Mirandola *et al.*, 2002).

A descrição do composto A23187 como um ionóforo deriva da sua habilidade de carrear o cálcio através das barreiras lipídicas. Assim como outros ionóforos, o A23187 é um ácido carboxílico lipossolúvel que se complexa ao cálcio, se difundindo através da membrana e liberando-o no interior das células, transportando-os assim do meio extracelular para o meio intracelular (Pressman, 1982; Peter *et al.*, 1972; Lawrence, 1975). Este aumento de cálcio ativa a proteína quinase C e induz a fosforilação de cadeias de miosina presentes no citoesqueleto de mastócitos, facilitando o processo de exocitose (Ludowyke, 1996). Este composto promove aumento de cálcio em suspensões de células peritoneais, incluindo células mastocitárias, sendo esse mecanismo associado à ação estimulante dos ionóforos na liberação de histamina (Foreman *et al.*, 1973).

O ionóforo A23187 é extremamente seletivo para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sendo rotineiramente utilizado no aumento deste íon no interior de células intactas. Devido ao processo de liberação de histamina ser cálcio dependente, o uso deste composto sobre células mastocitárias e basófilos é muito comum (Martina, 1994; Wang, 1994; Mongar, 1962).

Quanto ao composto 48/80, estudos demonstram que sua ação ocorre diretamente na membrana de mastócitos ligando-se a receptores associados à proteína G, os quais ativam a fosfolipase D, com consequente aumento da atividade da proteína quinase C e do fluxo de cálcio intracelular, ocorrendo a ativação dos mastócitos (Wang *et al.*, 1994, Palomaki & Laitinen, 2006). As mudanças iniciais promovidas pelo composto 48/80 ocorrem na superfície da célula e são compostas por duas fases, uma que se caracteriza pelo rápido aumento do cálcio intracelular e outra caracterizada por uma contínua liberação do cálcio intracelular (Gillespie *et al.*, 1968; Thon & Uvnas, 1967).

O composto 48/80 é um produto da condensação da p-metoxifenetil metilamina com formaldeído, sendo encontrados em uma mistura de dímeros e trímeros (Palomaki & Laitinen, 2006; Paton, 1951). É um potente agente indutor capaz de liberar seletivamente a histamina dos mastócitos por um processo de desgranulação exocitótica, primariamente de células mastocitárias, com a subsequente depleção de histamina tecidual (Paton, 1951; Bronner *et al.*, 1987; Niemegeers, 1978; Lagunoff, 1983). Outros estudos mostram que ocorre geração endógena de ácido lisofosfatídico, o qual também está envolvido com a liberação de histamina a partir dos mastócitos (Hashimoto *et al.*, 2005).

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que a seleção com base em dados populares ou etnofarmacológicos foi extremamente eficiente, visto que todos os extratos obtidos a partir das 4 diferentes espécies vegetais foram capazes de inibir a liberação de histamina em condições experimentais onde esta liberação foi estimulada por agentes secretagogos. Estes dados mostram que as 4 plantas medicinais utilizadas popularmente para o tratamento e prevenção de diferentes doenças, na qual a histamina é mediador chave, é respaldado pela capacidade destes extratos inibirem a secreção de histamina a partir de mastócitos estimulados. Por outro lado, é importante referir que todos estes extratos foram inativos em reduzir ou aumentar a liberação de histamina em condições normais, ou seja, sem a prévia estimulação por agentes secretores. O fato destas espécies vegetais não reduzirem a liberação de histamina nestas condições sugere que estas plantas medicinais são capazes de atuar apenas após a ocorrência de uma condição patológica onde a histamina é mediadora, como é o caso das doenças alérgicas e de hipersensibilidade. Por outro lado, a ineficiência destes extratos vegetais em aumentar a liberação de histamina em condições normais é um importante indicativo de que estas plantas não produzem efeitos de irritação, hipersensibilidade ou desenvolvimento de processos alérgicos e inflamatórios mediados pela histamina.

A análise dos resultados, obtidos com os diferentes extratos vegetais sobre a liberação de histamina induzida por ambos agentes secretagogos, permite identificar que os extratos de folhas e caules de *Hymenocarpus stigonocarpa*, folhas

de *Caesalpinia ferrea* e de *Byrsonima verbascifolia* são aqueles que produziram os melhores efeitos inibitórios sobre a liberação induzida de histamina. Com efeitos inferiores a estes, destacam-se aqueles produzidos pelos extratos de caule de *Byrsonima verbascifolia* e com efeitos inibitórios mais discretos os extratos de caule, raiz e sementes de *Acanthospermum australe*.

Os resultados obtidos neste estudo permitem identificar que os caules e folhas da espécie *H. stigonocarpa* é uma fonte potencial de produtos inibidores da secreção de histamina, visto que ambos inibiram, na concentração de 100 µg/ml, completamente a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80 e respectivamente em 96.45 e 97.80 % a liberação induzida por ionóforo A23187. Deve-se destacar que o extrato de folhas desta espécie produziu inibição máxima da liberação de histamina induzida pelo composto 48/80 na concentração de 30µg/ml e que esta inibição é concentração dependente. Por outro lado, o extrato de caule também inibiu de forma concentração dependente a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80, apresentando na menor concentração testada uma inibição de 79.80%. Estudos demonstram que as folhas desta espécie possuem em sua constituição uma série de compostos secundários, tais como sesquiterpenos, terpenos, flavonóides e esteróis (Langenheim *et al.*, 1983 e 1982; Doménech-Carbó *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2010). Todas estas classes de compostos secundários possuem inúmeras atividades biológicas, no entanto, a identificação dos constituintes responsáveis pela atividade biológica detectada requer estudos de fracionamento biomonitorado.

O extrato de folhas de *C. ferrea* também apresentou um comportamento concentração dependente na inibição da liberação de histamina induzida tanto pelo ionóforo A23187 como pelo composto 48/80. Nossos resultados são similares aos de Pinto, (2000) que confirmou a atividade inibidora desta espécie sobre a secreção de mastócitos de pulmão e intestino de cobaia.

Estudos fitoquímicos realizados com esta espécie por Santos & Sant'Ana (1985, *apud* Di Stasi, 2002) confirmaram a presença de ácidos palmítico, gálico, elágico e octacosanóico. Os triterpenos lupeol,  $\alpha$ -amirina e a presença de 3 flavonóides C-glicosilados, isoorientina, orientina e vitexina, foram detectadas por

Coelho (2004). É importante constar que o ácido gálico tem sido descrito como um produto capaz de inibir a secreção de histamina (Kim *et al.*, 2006). Os triterpenos isolados de *C. ferrea* são os mais comuns encontrados em plantas superiores e dentre as atividades biológicas atribuídas aos triterpenos isolados desta espécie pode-se citar a atividade antiinflamatória do lupeol e da  $\alpha$ -amirina (Geetha & Varalashmi, 2001).

Estudos feitos com diferentes extratos de *C. ferrea* revelaram a presença de atividades antiúlcera (Bacchi *et al.*, 1994), analgésica e anti-inflamatória (Carvalho *et al.*, 1996) anti-histamínica, antimicrobiana (Sampaio *et al.*, 2009) e antialérgica (Rossi-Ferreira, 1995 apud Di Stasi, 2002; Pinto, 2000). Recentemente sua atividade antitumoral também foi constatada por Nakamura *et al.* (2002).

Os resultados de *B. verbascifolia* obtidos neste estudo demonstraram que o extrato metanólico do caule e folhas apresenta importante atividade nas concentrações de 30 e 100  $\mu\text{g/ml}$  quando desafiados com composto 48/80 promovendo inibição respectivamente de 90.12; 88.80 no extrato de caule e 93.2 e 100 % no extrato de folhas. Quando desafiados com o ionóforo A23187 o extrato das folhas promoveu inibição de 90.38% na concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Estes resultados demonstram que a *B. verbascifolia* apresenta-se também como uma fonte potencial de constituintes químicos para o tratamento de afecções alérgicas.

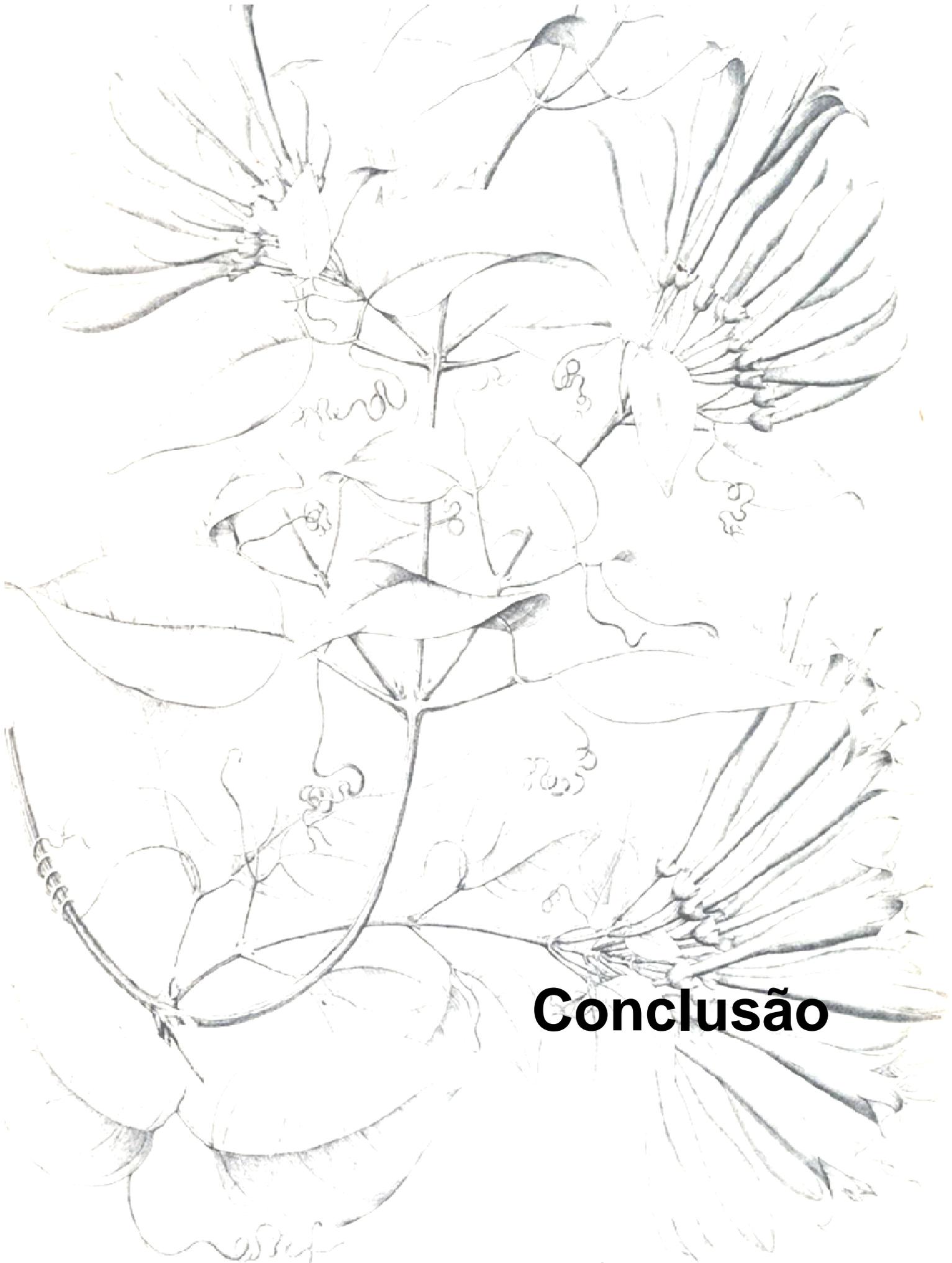
Até o momento, poucas espécies do gênero *Byrsonima* foram estudadas quimicamente. Foram isolados do tronco e folhas de *B. verbascifolia*, flavonóides, triterpenos e esteróis (Gottlieb *et al.*, 1975; Dosseh *et al.*, 1980) assim como fenóis e taninos (Castro, 2005). Dosseh *et al.*, (1980) também confirmou a presença de quercetina e isoquercetina nas folhas e caule desta espécie.

Os flavonóides apresentam diversas funções biológicas tanto para os organismos vegetais como animais. Inúmeros trabalhos relatam atividades antimicrobiana, antiviral, antineoplásica, anti-inflamatória, hepatoprotetora, anti-hipertensiva e hipoglicemiantes, além da capacidade de alguns destes compostos apresentarem atividade inibitória sobre a liberação de histamina de mastócitos (Duraismy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2010; Kimata *et al.*, 2000; Di Carlo *et al.*, 1999; Harbone & Williams, 2000).

A presença de quercetina no extrato metanólico da *B. verbascifolia* (Carvalho *et al.*, 1996; Coelho, 2004) sugere que a atividade inibitória das secreção de histamina verificada neste estudo possa estar associada à presença deste flavonóide (Fewtrell & Gomperts, 1977; Kimata *et al.*, 2000).

Os extratos da semente, caule e raízes da *A. australe* demonstraram que a *A. australe* semelhante a *A. hispidum* (Brandão *et al.*, 1988) possui ação inibitória sobre a secreção de histamina promovidos pelo ionóforo A23187 e também pelo composto 48/80.

Estudos fitoquímicos realizados com esta espécie confirmaram a presença de diterpenos e sesquiterpenolactonas (Bohlmann *et al.*, 1981; Herz & Kalyanaraman, 1975), monoterpenos e alcalóides (Bohlmann *et al.*, 1981), além de flavonóides (Shimizu *et al.*, 1987), como a peduletina, crisosplenol D, axillarina, rutina, quercetina, trifolina e hiperina (Debenedetti *et al.*, 1987). Alguns flavonóides que ocorrem naturalmente em plantas, como a rutina e quercetina, apresentam atividade inibitória sobre a liberação de histamina dos mastócitos da cavidade peritoneal de ratos, sendo caracterizada pela diminuição do influxo de cálcio e de algumas quinases reguladas por sinais extracelulares, sendo esta última relacionada com a liberação de leucotrienos e prostaglandinas (Duraisamy *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2010; Kimata *et al.*, 2000; Di Carlo *et al.*, 1999).



**Conclusão**

A análise dos resultados nos permite concluir que os extratos metanólicos da *A. australe*, *C. ferrea*, *B. verbascifolia* e *H. stigonocarpa* apresentam atividade inibitória sobre a liberação induzida de histamina a partir de mastócitos. Dentre as quatro espécies, *H. stigonocarpa* e *C. ferrea* destacam-se por produzirem inibição máxima da liberação de histamina induzida, caracterizando-se como importante fonte de constituintes químicos com potencial uso no tratamento de doenças na qual a histamina é mediador chave.



## **Bibliografia**

AGRA, M.F. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais na Paraíba.** In Simpósio de Plantas Medicinas do Brasil, UFMG, Belo Horizonte, anais, 7, 1982.

AGUIAR, R.M.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. **Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*.** Phytochemistry. v.66, p.2388–2392, 2005.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado – espécies vegetais úteis.** Embrapa-CPAC, Planaltina,DF, 464p., 1998.

ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. **Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich).** Journal of Chromatography, v. 985, p. 297-301, 2003.

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. **A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*.** Planta Medica, v.60, p. 85-86, 1994.

ARAÚJO, E.L.; RANDAU, K.P.; SENA-FILHO, J.G.; PIMENTEL, R.M.M.; XAVIER, H.S. ***Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, p.777-784, 2008.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. **Identificação cromatográfica e ação farmacológica de extratos de *Styrax camporum* Pohl e *Caesalpinia ferrea* Martius.** Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, v.27, p. 137-149, 1991.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. **Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*.** Planta Medica, v. 61, p. 204-207, 1994.

BARNES, P.J. **Pathophysiology of asthma.** British Journal of Clinical Pharmacology, v. 42, p.3-10, 1996.

BENOIST, C.; MATHIS, D. **Mast cells in autoimmune disease.** Nature, v.420, p.875-878, 2002.

BEST, C.H., DALE, H.H., DUDLEY, J.W.; THORPE, W.V. **The nature of the vasodilatador constitueints of certain tissue extract.** The Journal of Physiology, v.62, p.397-417, 1927.

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

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; DHAR, A.K.; KING, R.M.; ROBINSONI, H. **Two Sesquiterpene and three diterpene lactones from *acanthospermum australe*.** Phytochemistry, v. 20,p. 1081-1083, 1981.

BRONNER, C.; WIGGINS, C.; MONTÉ, D.; MÄRKI, F.; CAPRON, A.; LANDRY, Y.; FRANSON R.C. **Compound 48/80 is a potent inhibitor of phospholipase C and a dual modulator of phospholipase A2 from human platelet.** Biochimica et Biophysica Acta, v.920, p.301-305, 1987.

CACERES, A.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. **Plants used in guatemala for the treatment of respiratory-diseases. 2: Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria.** The Journal of Ethnopharmacology, v. 39, p. 77-82, 1993.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S.; SARTI, S. **Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract.** The Journal of Ethnopharmacology, v. 53, p. 175-178, 1996.

CASTRO, A.H.F.; ALVARENGA, A.A.; SOARES, A.M.; YOUNG, M.C.M.; PURCINO, A.A.C. **Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.7, p.45-55, 2005.

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

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.

CHURCH, M.K.; LEVI-SCHAFFER, F. **The human mast cell.** Journal of Allergy clinical immunology. v. 99, p.155-160, 1997.

CLAPHAM, J.; KILPATRICK, G.J. **Histamine H3 receptors modulate the release of [H3]-acetylcolina from slices of rate entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H3 receptor subtypes.** British Journal of Pharmacology, v.107, p.919-923, 1992.

COELHO, R.G. “**Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia férrea* (Caesalpinaceae)**”; 2004. Dissertação (Doutorado em química) – Instituto de ciências exatas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

COGE, F.; GUENIN, S.; RIQUE, H.; BOUTIN, J.; GALIZZI, J. **Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene.** Biochemical and Biophysical Research communications, v.284, p.301-306, 2001.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** 6 volumes. IBDF, Brasília-DF, 1926.

CRIADO, P.R.; MARUTA, C.W.; CRIADO, F.R.J.; FILHO, C.D.M. **Histamina, Receptores de histamina e anti-histaminicos: Novos conceitos;** Annais Brasileiro de Dermatologia. V.85, p.195-210, 2010.

CRUZ, G.L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil.** Belo Horizonte, MG, 2 volumes, 863p., 1965.

DEBENEDETTI, V.S.; MARTINO, P.; PALACIOS, P.; COUSSI, J.D. **6-methoxy flavonoids from *Acanthospermum australe*,** Brief Reports, p.325, 1987.

DEL VALLE, J.; GANTZ, I. **Novel insights into histamine H<sub>2</sub> receptor biology,** American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology , v.273, p.987-996, 1997.

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.

DI STASI L. C., MARONI, B. C., MACHADO, S. R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, São Paulo, 2006.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GONZALEZ, F. G.; PORTILHO, W. G. Violaes medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, São Paulo, 2002. cap. 18, p. 177-199.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; SANTOS, C.; GUIMARÃES, E.M. **Plantas medicinais da medicina popular no município de Botucatu (SP)**. In Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Anais, Fortaleza, p.320, 1994.

Di Stasi, L.C. ; GOMES, J. C.; VILEGAS, W. **Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of Anchieta salutaris**. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 47, p. 890-893, 1999.

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

DOMÉNECH-CARBÓ, A., M.T.; CRUZ-CÃNIZARES J.; OSETE-CORTINA, L.; DOMÉNECH-CARBÓ, A.; DAVID, H. **Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart**. International Journal of Mass Spectrometry, v.284, p.81–92, 2009.

DOSSEH, C.; MORETTI, C.; TESSIER, A.M.; DELAVEAU, P. **Étude chimique des feuilles de byrsonima verbascifolia Rich. Ex Juss**. Plantes médicinales et phytothérapie, v.15, p. 136-142, 1980.

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.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.M.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina, Editora da UFSC, Rio Grande do Sul, 1999, p. 87-100.

EMANUEL, M.B. **Histamine and the antiallergic antihistamines: A History of their discoveries**. Clinical and experimental allergy, v.29, p.1-11, 1999.

FERRY, X.; EICHWALD, V.; DAEFFLER, L.; LANDRY, Y. **Activation of  $\beta\gamma$  subunits of  $G_{i2}$  and  $G_{i3}$  proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipase  $C\beta$  and arachidonate release through phospholipase  $C\gamma$  in mast cells**. The Journal of Immunology, v.167, p.4805-13, 2001.

FEWTRELL, C.M.S; GOMPERS, B.D. **"Quercetin" a novel inhibitor of  $Ca^{2+}$  influx and exocytosis**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 469, p.52-60, 1977.

FIGUEIREDO, M.E.; MICHELIN, D.C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M.A.; SANTOS, L.C.; ALMEIDA L.F.R.; BRITO, A.R.M.S.; SALGADO, H.R.N.; VILEGAS, W. **Chemical evaluation and antidiarrhoeal activity of leaves of *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae)**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences'. vol.41, p.79-83, 2005.

FOREMAN, J. C. GOMPERS, B. D.; MONGAR, J.L. **Calcium Ionophores and Movement of Calcium Ions following the Physiological Stimulus to a Secretory Process**. Nature. V.245, p.249-251, 1973.

FRASSON, A.P.Z.; BITTENCOURT, C.F.; HEINZMANN, B.M. **Caracterização física e biológica do caule de *Caesalpinia férrea* Mart.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13, p.35-39, 2003.

GALLI, S.J.; NAKAE, S.; TSAI, M. **Mast cells in the development of adaptive immune responses**. Nature Immunology, V. 6, p. 135-142, 2005.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. **Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats**. Journal of Ethnopharmacology, v.76, p.77-80, 2001.

GIBBS, P.E.; OLIVEIRA, P.E.; BIANCHI, M.B. **Postzygotic control of selfing in *hymenaea stigonocarpa* (leguminosae caesalpinioideae), a bat-pollinated tree of the brazilian cerrados.** International Journal of Plant Sciences. v.160, p.72–78, 1999.

GILLESPIE, E.; LEVINE, R.J.; MALAWISTA S.C. **Histamine release from rat peritoneal mast cells, inhibition by colchicine and potentiation by deuterium oxide.** The journal of pharmacology and experimental therapeutics; Vol. 164, p.163-165, 1968.

GOMES, J. C.; DI STASI, L. C.; SGARBOSA, F.; BARATA, L.E.S. **Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchieta salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig.** Allergy immunology, v.103, p.1888-193, 1994.

GOTTLIEB, O. R.; MENDES, H.P.; MAGALHÃES, M.T. **Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*.** Phytochemistry, v. 14, p. 1456-1456, 1975.

GURISH, M.F.;BOYCE, J.A.; MASS, M.D.B. **Mast cells: Ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.117, p. 1285 – 1291, 2006.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. **Advances in flavonoids research since 1992.** Phytochemistry, v. 55, p.481-504, 2000.

HASHIMOTO, T., OHATA, H., MOMOSE, K. & HONDA, K. **Lysophosphatidic acid induces histamine release from mast cells and skin fragments.** Pharmacology., v.75, p.13–20, 2005.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M., **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.** 3.ed. London: Churchill Livingstone, 2004.

HERZ, W.; KALYANARAMAN, P.S. **Acanthospermal A and Acanthospermal B, Two New Melampolides from *Acanthospermum* Species.** The Journal of Organic Chemistry, v.40, p.3486-3491, 1975.

HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., RODRIGUEZ, J.A., HAUN, M., NUNES, D.S., SOUZA BRITO, A.R.M. **Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae).** Journal of Ethnopharmacology, v.69, p.229–234, 2000.

HOLGATE, S.T. **The epidemic of allergy and asthma.** Nature, v.402, p.1-4, 2000.

HOUGH, L.B. **Genomics Meets Histamine Receptors: New Subtypes, New Receptors.** Molecular Pharmacology, v. 59, p.415-419, 2001.

HOUGH, L.B. **Histamine, in basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.** Lippincott-Raven, Philadelphia, p.293-313, 1999.

JARRETT, E.E.E.; HAIG, D.M. **Mucosa mast cell in vivo and in vitro.** Immunology today, v.5, p.115-118, 1984.

JOHNSON, A.R.; HUGLIT, T.E.; MULLER-EBERHARD, H.J. **Release of Histamine From Rat Mast Cells by the Complement Peptides C3a and C5a.** Immunology, v. 28, p.1067-1080, 1975.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 12.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. (Biblioteca Universitária. Série 3 – Ciências Puras, v. 4), 1998.

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.

KAPLAN, A.P. **Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria.** Allergy and immunology, v.129, p.254-260, 2002.

KATZUNG, B.G. **Basic & clinical pharmacology.** international edition; Section IV Drugs with important actions on smooth muscle; Chapter 16; Histamine, serotonin & the ergot Alkaloids; Bertram p.265-291; Medical publishing division; 2007.

KIM, S.; JUN, C.; SUK, K.; CHOI, B.; LIM, H.; PARK, S.; HO LEE, S.; SHIN H.; DAE-KEUN, K.; TAE-YONG, S. **Gallic Acid Inhibits Histamine Release and**

**Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells;** Toxicological sciences., v. 91, p.123–131, 2006.

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

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.

KIRSHENBAUM, A. **Regulation of mast cell number and function.** Hematology/Oncology Clinics of North America, Philadelphia, v.14, p.497-516, 2000.

LAGUNOFF, D.; MARTIN, T.W. **Agents that release histamine from mast cells.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v.23, p.331-351, 1983.

LAGUNOFF, D. **Membrane fusion during mast cell secretion.** Journal of Cell Biology, v.57, p. 252-259, 1973.

LANGENHEIM, J.H.; LINCOLN, D.E.; STUBBLEBINE, H.H.; GABRIELLI, A.C. **Evolutionary Implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea (caesalpinioideae: leguminosae)*.** American Journal of Botany, v.69, p.595-607, 1982.

LANGENHEIM, J.H.; HALL, G.D. **Sesquiterpene Deterrence of a Leaf-Tying Lepidopteran, *Stenoma ferrocannela*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil.** Biochemical Systematics and Ecology, v. 1, p. 29-36, 1983.

LAWRENCE M. L. **The mechanism of basophil histamine release induced by antigen and by the calcium ionophore a231871.** The Journal of Immunology, v. 114, p.1692- 1699, 1975.

LEUNG, K.B.P.; PEARCE, F.L. **A comparison of histamine secretion from peritoneal mast cells of the rat and hamster.** British Journal of Pharmacology, v.81, p.693-701, 1984.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, p.512, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Editora do Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p.246, 1998.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.** 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

LUDOWYKE, R.I.; SCURR, L.L.; MCNALLY, C.M. **Calcium ionophore-induced secretion from mast cells correlates with myosin light chain phosphorylation by protein kinase C.** The Journal of Immunology, v.157, p.5130-5138, 1996.

LUQUE, F.J.; ILLAS, F.; POUPLANA, A. **On the Mechanism of Histamine H<sub>2</sub> Receptor Activation.** Molecular Pharmacology, v.32, p.557-563, 1986.

MARONI BC, DI STASI LC, MACHADO SR. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu – guia ilustrado.** Fundação Editora Unesp, São Paulo, p.194, 2006.

MARTINA, M.; KILIĆ, G.; CHERUBINI, E. **The effect of intracellular Ca<sup>2+</sup> on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture.** Journal of Membrane Biology. v.142, p.209, 1994.

MARTINS, L. R. R.; CORTEZ, L. E. R.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. **Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do acetato de acantoaustralida.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, p. 490-496, 2006.

MARTINS, L.R.R.; MOURÃO, K.S.M.; ALBIERO, A.L.M.; CORTEZ, D.A.G.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. **Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl .) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae).** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.16, p. 42-52, 2006.

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

MIRAMBOLA, L.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. **Modulation by *acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice**. Immunopharmacology and immunotoxicology, v24, p275-288, 2002.

MONGAR, J.L.; SCHILD, H.O. **Cellular Mechanisms in Anaphylaxis**. Physiology Review, v.42, p. 226, 1962.

MORI, S.; SAINO, T.; SATOH, Y. **effects of low temperatures on compound 48/80 induced intracellular  $ca^{2+}$  changes and exocytosis of rat peritoneal mast cells**. Archives of Histology and Cytology, v.63, p.261-270, 2000.

MORS WB, RIZZINI CT, PEREIRA NA. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac Ref Publications Inc., 2000. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. v.403, p.853-858, 2000.

MOUSLI, M.; BRONNER, C.; LANDRY, Y.; BOCKAERT, J.; ROUOT, B. **Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80**. Elsevier, v.259, p.260-262, 1990.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKIA, F.; ARISAWAA, M.; MUKAINAKAB, T.; OKUDAB, M.; TOKUDAB, H.; NISHINOB, H.; PASTORE, J.F. **Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds**. Cancer Letters, v.177, p. 119–124, 2002.

NAVICKIS, L.L. **Corn flour addition to wheat flour doughs – effect on rheological properties**. Cereal Chemistry, v.64, p.307-310, 1987.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 years**. Journal of Natural Products, v. 70, p. 461-477, 2007.

NIEMEGEREERS, C. J.; AWOUTERS, F.; NUETEN, V.; DE NOLLIN, S.; JANSSEN, P.A. **Protection of rats from compound 48/80-induced lethality. A simple test**

**for inhibitors of mast cell-mediated shock.** Archives Internacionales of Pharmacodynamie et de therapie, v.234, p.164-176, 1978.

ODA, T.; MORIKAWA, N.; SAITO, Y.; MASUHO, Y.; MATSUMOTO, S. **Molecular cloning and characterization of a new histamine receptor preferentially expressed in leukocytes.** The Journal of Biological chemistry, v.275, p.36781-36786, 2000.

PALOMAKI, V.A.B.; LAITINEN, J.T. **The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain sections.** British Journal of Pharmacology, v.147, p.596-606, 2006.

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

PARSONS, M.E.; GANELLIN, C.R. **Histamine and its receptors.** British Journal of Pharmacology, v.147, p.127-135, 2006.

PATON, W.D.M. **Compound 48/80: A potent histamine liberator.** British Journal of Pharmacology. v.6, p.499-508, 1951.

PATON, W.D.M. **Histamine release by compounds of simple chemical structure.** Pharmacology Reviews, v.9, p. 269-328, 1957.

PETER W. R.; LARDY, H.A. **A23187: A Divalent Cation Ionophore.** The Journal of Biological chemistry, v. 247, p. 6970-6977, 1972.

PETERSEN, L. J.; MOSBECH, H.; SKOV, P. S. **Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: Characterization of factors influencing histamine releasability.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 97, p. 672-679, 1996.

PINTO, E. A. T. **“Atividade de extratos de *Anchietia salutaris* St. Hil. e *Caesalpinia ferrea* Mart. sobre a secreção de mastócitos de pulmão e**

**intestino de cobaia. Comparação com drogas antialérgicas**". 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2000.

PRESSMAN, B. C. Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.22, p.465-490, 1982.

RANG HP, DALE MM, RITTE JM, MOORE PK. **Farmacos antiinflamatórios e imunossupressores**. In: Rang HP. *Farmacologia* (tradução). 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 272-273, 2004.

RILEY, J. F.; WEST, G. B. **The presence of histamine in tissue mast cells**. *The Journal of Physiology*, v.120, p.528-537, 1983.

RIZZINI, C. T. **Plantas do Brasil: árvores e madeiras uteis do Brasil – manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blucher, p.294, 1971.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. UFLA, Lavras, p.180, 2001.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V; DIASC, C. S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.F. ***In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.289–294, 2009.

SANCHEZ, M.; KRAMER, F.; BARGARDI, S.; PALERMO, J.A. **Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe***. *Phytochemistry Letters*, v.2, p.93–95, 2009.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. Porto Alegre: Rígel, p. 208, 1989.

SANTANA, A.L.B.D.; MARANHÃO, C.A.M.; SANTOS, J.C.; CUNHA, F.M.; CONCEIÇÃO, G.M.; BIEBER, L.W.; NASCIMENTO, M.S. **Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger***. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.64, p.7–12, 2010.

SENOL, M.; OZEROL, I. H.; PATEL, A.V.; SKONER, D.P. **The effect of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase inhibition by ouabain on histamine release from human cutaneous mast cells**, *Molecular and Cellular Biochemistry*. v.294, p. 25–29, 2007.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. **Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin**. *Planta medica*, v.56, p.36-40, 1990.

SHIMIZU, M.; HORIE, S.; ARISAWA, M.; HAYASHI, T.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; KAWASAKI, M.; TERASHIMA, S.; TSUJI, H.; WADA, S.; UENO, H.; MORITA, N.; BERGANZA, L.H.; FERRO, E.; BASUALDO, I. **Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldose reductase inhibitor from “Tapecué”, *Acanthospermum australe* O.K.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.35, p.1234-1237, 1987.

SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; COHN, JR.VH. **A method for the fluorometric assay of histamine in tissues**. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.127, p.182-190, 1959.

SILVA, J. A.; SILVA D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília, DF: EMBRAPA/CPAC, 1994.

SIRIGANIAN, R.P. **Na automated continuous-flow system for the extractions and fluorometric analysis of histamine**. *Analytical Biochemistry*, v.57, p.387-394, 1974.

SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. **Histamine, bradykinin and their antagonists**. *In* Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. (eds.) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, New York, USA, 11<sup>th</sup> edition, p.629-651, 2006.

THON, I.L.; UVNÄS. B. **Degranulation and histamine release, two consecutive steps in the response of rat mast cells to compound 48/80**. *Acta Physiologica Scandinavica*. v.71, p.303, 1967.

THURMOND, R.L.; DESAI, P.J.; DUNFORD, P.J.; FUNG-LEUNG, W.; HOFSTRA, C.L.; JIANG, W.; NGUYEN, S.; RILEY, J.P.; SUN, S.; WILLIAMS, K.N.; EDWARDS, J.P.; KARLSSON, L. **A Potent and Selective Histamine H<sub>4</sub>**

**Receptor Antagonist with Anti-Inflammatory Properties.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.309, p. 404-413, 2004.

THURMOND, R.L.; GELFAND, E.W.; DUNFOND, P.J. **The role of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>4</sub> receptors in allergic inflammation: The search for new antihistamines.** Nature reviews, v.7, p.41-53, 2008.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S.M. **Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart.** Phytomedicine, v.8, p. 377–381; 2001.

VELOSO, C.C.; BITENCOURTA, A.D.; CABRALA, L.D.M.; FRANQUI, L.S.; DIAS, D.F.; SANTOS, M.H.; SONCINIA, R.; GIUSTI-PAIVA, A. **Pyrostegia venusta attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v.132, p.355–358, 2010.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. **Gênero Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos.** Revista Química Nova, v.28, p.85-94, 2005.

WANG, X.; SADA, K.; YANAGI, S.; YANG, C.; REZAUL, K.; YAMAMURA, H. **Intracellular Calcium Dependent Activation of p72 in Platelets.** The Journal of Biochemistry, v.116, p. 858, 1994.

WILLE, J.J.; KYDONIEUS, A.F. **Mast cell degranulating agents modulate skin immune responses.** In Kydonieus AF, Wille JJ (eds). Biochemical modulation of skin reactions. Transdermals, topicals, cosmetics. CRC Press, Danvers, USA, p.245-259, 2000.

YOSHIDA, M.; TAKAHASHI, Y.; INOUE S. **Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H<sub>2</sub> receptors in human normal melanocytes.** Journal of Investigative Dermatology, v.114, p.334-342, 2000.

ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. **The role of histamine H<sub>4</sub> receptor in immune and inflammatory disorders.** British Journal of Pharmacology, v.157, p.24–33, 2009.

ZHAO, Z.Z.; SUGERMAN, P.B.; ZHOU, X.J.; WALSH, L.J.; SAVAGE, N.W. **Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus.** Oral Diseases, v.7, p. 246-51, 2001.