



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**Prospecção biomonitorada de inibidores da secreção de histamina
obtidos a partir do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart
ex Hayne (Fabaceae)**

ADRIANO CRESSONI ARAUJO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de Concentração Atividades Biológicas
de Produtos Naturais

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

BOTUCATU – SP

2013

Lafit-Botu
IB-Unesp-Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIEÊNCIAS DE BOTUCATU

**Prospecção biomonitorada de inibidores da secreção de histamina
obtidos a partir do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart
ex Hayne (Fabaceae)**

ADRIANO CRESSONI ARAUJO

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CLÁUDIO DI STASI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de Concentração Atividades Biológicas
de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

BOTUCATU – SP

2013

Lafit-Botu
IB-Unesp-Botucatu

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Araujo, Adriano Cressoni.

Prospecção biomonitorada de inibidores da secreção de histamina obtidos a partir dos extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne / Adriano Cressoni Araujo. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 20100000

1. Plantas medicinais – Uso terapêutico. 2. Histamina. 3. Mastócitos.
4. *Hymenaea stigonocarpa*. 5. Jatoba-do-cerrado.

Palavras-chave: Composto 48/80; Fracionamento biomonitorado; Histamina; *Hymenaea stigonocarpa*; Ionóforo A 23187; Mastócitos; Ovoalbumina.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha esposa Elen, com quem tenho o privilégio de dividir os bons e maus momentos de minha vida, por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me incentivando e que, em nome da família nunca hesitou diante de esforços pessoais;

Dedico também esse trabalho a minha filha Júlia, que soube entender minha ausência em alguns momentos dessa fase tão importante de sua vida;

À minha irmã Juliana, pelo constante incentivo e apoio e

A meus pais, Luiz e Maria, pelo inesgotável apoio e principalmente por ensinarem os princípios morais pelos quais sempre tendo norteado minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, pela orientação sempre atenciosa e pelo comportamento ético que terei sempre como exemplo em minha vida profissional;

Ao Dr. Leonardo Noboru Seito, pelo auxílio na realização dos experimentos, pela paciência e pela amizade;

À Dra. Juliana Aparecida Severi, pelo auxílio nas análises fitoquímicas, pela atenção e amizade;

Aos amigos do LaFit-Botu, Adriana Del Ben, Alexandre da Silveira Chagas, Aline Witaicenis Fantinati, Ana Elisa Valencise Quaglio, Camila Hiromi Chiba, Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa, Fabiana Masago, Juliana Rocha Ribeiro, Patrícia Rodrigues Orsi, Laura Orsi Machado, Luiz Domingues de Almeida Júnior, Tainan Freitas Salmeron Curimbaba, Tarina Lins Ferreira, Ubirajara Lanza Júnior e em especial ao Alexandre Tanimoto pelo constante apoio e sempre sincero auxílio durante a realização desse trabalho;

Ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial ao assistente técnico de suporte acadêmico Luiz Antonio de Oliveira, pela atenção e valioso auxílio prestado durante a realização desse trabalho;

À Universidade de Marília, em especial aos professores da disciplina de Morfofisiologia do Curso de Medicina e ao professor Joelson Isaac Braga da Motta, por possibilitarem a ausência em minhas atividades acadêmicas que possibilitou a realização desse trabalho;

Aos professores Dr. Silvio Luis de Oliveira, Dra. Alessandra Gambero, Dr. Jairo Kenupp Bastos e Dra. Noeli Pereira Rocha por doarem parte de seu precioso tempo e aceitarem participar da comissão examinadora.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e

A Deus, por me proporcionar o encontro com pessoas tão especiais, tanto no ambiente familiar, nas amizades e no trabalho, pessoas sem as quais dificilmente conseguiria realizar esse trabalho.

Resumo

As reações alérgicas afetam grande parte da população e tem aumentado nos últimos anos. Nesse sentido, a histamina liberada pelos mastócitos é um mediador importante e a procura por compostos que inibam a liberação do referido mediador se faz necessária tendo em vista que os tratamentos disponíveis apresentam limitações. Estudos prévios demonstraram que o extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* (ME) apresenta atividade inibitória sobre a liberação de histamina. Assim, o presente trabalho realizou o fracionamento biomonitorado do ME a fim de identificar a(s) frações mais ativa(s). As frações foram avaliadas em suspensão de mastócitos peritoneais de ratos Wistar machos desafiados com ionóforo A23187 e composto 48/80 (apenas as frações mais ativas). Posteriormente, a fração mais ativa foi avaliada em mastócitos sensibilizados com ovoalbumina (OVA). A dosagem de histamina foi realizada utilizando-se um sistema fluorimétrico automatizado e a análise fitoquímica por CG/EM. Os resultados mostraram que a fração acetato de etila foi a mais ativa e, na concentração de 100 µg/mL inibiu em 78, 98 e 85% a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187, composto 48/80 e OVA respectivamente. O fracionamento biomonitorado desta fração por cromatografia líquida sob vácuo (CLV) gerou seis sub-frações, das quais as mais ativas demonstraram ser constituídas por terpenos e ácidos graxos de cadeia longa.

Palavras-chave: *Hymenaea stigonocarpa*; fracionamento biomonitorado; histamina; mastócitos; ionóforo A23187; composto 48/80 e ovoalbumina.

Abstract

Allergic reactions affect most of the population and has increased in recent years. Accordingly, histamine released by mast cells is an important mediator and search for compounds that inhibit release of that mediator is necessary in order that the treatments available have limitations. Previous studies demonstrated that the crude methanol extract of the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* (ME) has an inhibitory activity on the histamine release. Thus, the present study performed the bioguided fractionation of the ME in order to identify (s) most active fractions (s). The fractions were evaluated on the histamine release from rat peritoneum mast cells challenged with ionophore A23187 and compound 48/80 (only the most active fractions). Subsequently, the most active fraction was evaluated in mast cells sensitized with ovalbumin (OVA). The dosage of histamine was performed using an automated fluorimetric system and phytochemical analysis by GC/MS. The results showed that the ethyl acetate fraction was the most active and at concentration of 100 µg/mL inhibited by 78, 98 and 85% histamine release induced by ionophore A23187, compound 48/80 and OVA, respectively. The bioguided-fractionation of this fraction by vacuum liquid chromatography (VLC) generated six sub-fractions, of which the most actives showed the presence of terpenes and long chain fatty acids.

Key Words: *Hymenaea stigonocarpa*; bioguided fractionation; histamine; mast cells; ionophore A23187; compound 48/80 and ovalbumin.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - Triagem de plantas com atividade inibitória sobre a liberação de histamina	8
Evaluation of potential uses of Brazilian medicinal plant to treat allergic diseases.....	9
using histamine release inhibition assay.....	9
Background.....	11
Methods	12
Results	15
Discussion.....	21
Conclusion.....	24
References	25
CAPÍTULO 2 - Fracionamento do extrato metanólico bruto da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	29
1 – Material e método	30
1.1 – Reagentes e materiais	30
1.2 - Material Vegetal.....	30
1.2.1. Coleta e processamento pós-coleta.....	30
1.2.2. Preparo do extrato metanólico bruto da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (EM).....	31
1.2.3. Fracionamento do EM	31
1.2.4. Fracionamento da fração acetato de etila (P2).....	31
1.3 – Avaliação fitoquímica do EM, frações e subfrações	32
1.3.1 – Triagem fitoquímica do EM e da P2	32
1.3.2 – Avaliação do perfil cromatográfico do EM, das frações e subfrações por CCD	32
1.3.3 – Avaliação do perfil cromatográfico das subfrações da P2 por CG/EM	33
2 - Resultados	33
2.1 – Rendimento dos processos de preparo e fracionamento do EM.....	33
2.2 – Triagem fitoquímica do EM e da P2	34
2.3 – Avaliação do perfil cromatográfico do EM, das frações e das subfrações por CCD.	35
2.4 – Avaliação fitoquímica das subfrações da P2 por CG/EM	36
CAPÍTULO 3 - Avaliação do efeito <i>in vitro</i> das frações e subfrações do extrato metanólico bruto da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> sobre a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos.....	45
1 - Avaliação do efeito <i>in vitro</i> das frações e subfrações do extrato metanólico bruto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (ME) sobre a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos	46

1.1 – Material e método	46
1.1.1 – Reagentes.....	46
1.1.2 – Animais.....	47
1.1.3 – Obtenção da suspensão de mastócitos	47
1.1.4 – Protocolo experimental.....	47
1.1.5 – Determinação da liberação de histamina	48
1.1.6 – Análise estatística	49
1.2 – Resultados.....	49
2 – Padronização do protocolo para sensibilização dos animais com ovoalbumina (OVA)	54
2.1 – Reagentes.....	55
2.2 - Animais	56
2.3 – Obtenção da suspensão de mastócitos	57
2.4 – Protocolo experimental.....	57
2.5 – Determinação da liberação de histamina	57
2.6 – Resultados.....	58
3 – Avaliação do efeito <i>in vitro</i> da fração P2 sobre a liberação de histamina em mastócitos peritoneais de ratos Wistar sensibilizados com OVA	59
3.1 – Reagentes.....	59
3.2 - Animais	60
3.3 – Obtenção da suspensão de mastócitos	60
3.4 – Protocolo experimental.....	60
3.5 – Determinação da liberação de histamina	61
3.6 – Resultados.....	61
CAPÍTULO 4 - Pesquisa de inibidores da secreção de histamina a partir do extrato metanólico bruto das cascas do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	62
Search of inhibitors of histamine secretion from the crude methanol extract of the stem bark of <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	63
1 - Introduction	64
2 - Material and Methods.....	65
2.1 – Drugs and chemicals.....	65
2.2 – Plant Material	66
2.3 – Preparation of the crude methanolic extract of stem bark of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (ME)	66
2.4 – Chemical analysis and fractionation of methanolic extract of stem bark of <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	66
2.5 – Experimental protocol	67
2.5.1 – Animals.....	67
2.5.2 – Obtaining cell suspensions	67

2.5.3 – In vitro treatments.....	68
2.5.4 – In vitro treatment with fraction P2 in sensitized animals with ovalbumin (OVA).....	68
2.5.5 – Determination of histamine release	68
2.6 – Statistical Analysis	69
3 - Results	69
3.1 – Yield of the extractive methods.....	69
3.2 – Effect of <i>in vitro</i> treatment with vehicle and fractions from ME on the spontaneous and induced histamine release in suspensions of rat peritoneal mast cells	70
3.3 – Effect of <i>in vitro</i> treatment with sub-fractions from P2 on the spontaneous and induced histamine release in suspensions of rat peritoneal mast cells	72
3.4 – Effect of <i>in vitro</i> treatment with the fraction P2 on the histamine release induced by antigen (OVA) in suspensions of peritoneal mast cells of male Wistar rats sensitized ...	76
3.5 – Phytochemical analysis of the sub-fractions from P2 by GC / MS	76
4 – Discussion.....	81
5 – Conclusion.....	84
References	84
CAPÍTULO 5 - Considerações finais.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

INTRODUÇÃO

A incidência das reações de hipersensibilidade tipo I tem aumentado nas últimas décadas (Rosenwasser, 2011; Yang et al., 2013), com destaque para a asma, rinite (Hofmann e Abrahan, 2010, Kim et al., 2009) e as alergias alimentares (Sicherer e Leung, 2013). Nestes processos estão envolvidos diversos mediadores, que podem ser liberados por células do sistema imune ou serem sintetizados diretamente no plasma ou nos tecidos. Neste contexto, os mastócitos são as células que desempenham um papel importante não apenas nas reações alérgicas, mas também nas inflamatórias (Amin, 2012; Hofmann e Abrahan, 2010, Kim et al., 2009; Kim et al., 2013; Lee, 2006; Okayama et al., 2008; Park et al., 2008; Salinas et al., 2008), sendo encontrados em quantidades significativas nos tecidos com estreita relação com o ambiente externo como pele, trato gastrintestinal e trato respiratório (Huber, 2013; Kim et al., 2013).

Dentre os mediadores liberados pelos mastócitos, a histamina destaca-se especialmente na fase inicial das reações de hipersensibilidade imediata (Amin, 2012; Hofmann e Abrahan, 2010; Sipos et al., 2012) e nos processos inflamatórios agudos (Kim e Song, 2012). É uma molécula hidrofílica que nos mamíferos, é formada nos basófilos (sangue) e principalmente nos mastócitos (tecidos) pela descarboxilação da histidina através da L-histidina descarboxilase (Nagashima et al., 2012). Ambas as células tem a capacidade de sintetizar a histamina e armazená-la em grânulos secretórios juntamente com proteases e heparina. Está amplamente distribuída nos mamíferos, especialmente em tecidos ricos em mastócitos como pulmões, intestino e pele. Além dos mastócitos e basófilos, a histamina é encontrada nas células de Langerhans da epiderme, nas células enterocromafins da mucosa gástrica, alguns neurônios do Sistema Nervoso Central, liquor e células de tecidos em regeneração ou de rápido desenvolvimento (Skidgel e Erdös, 2006).

Sucintamente, após contato com o antígeno, as células apresentadoras de antígeno capturam e fragmentam esse antígeno (chamado então de peptídeo antigênico) e o apresentam para os linfócitos T CD₄, que então, se diferenciam em linfócitos Th2. Esses por sua vez, liberam citocinas que estimulam a produção de IgE específica por linfócitos B ativados (plasmócitos). Após sua liberação, a IgE se liga ao receptor FcεRI de alta afinidade na superfície dos mastócitos, que ficam sensibilizados (Wadsworth e cols., 2011). Em uma nova exposição, a ligação do antígeno a IgE ligada ao receptor FcεRI leva a degranulação e liberação de histamina, proteases e heparina (Amin, 2012; Chang et al., 2011; Hofmann e Abrahan, 2010; Huber, 2013; Salinas et al., 2008; Wadsworth et al., 2011; Weller et al.,

2011). Após sua liberação, pode interagir com receptores H₁, H₂, H₃ e H₄ (O'Mahony et al., 2011; Walter et al., 2011). A histamina é metabolizada pela imidazol (histamina)-n-metil-transferase, com formação de n-metil-histamina que sofre ação da MAO (monoaminooxidase) sendo convertida em ácido metil-imidazol acético. Outra via de metabolismo é a desaminação pela DAO (diaminoxidase) formando ácido imidazol acético (Skidgel e Erdös, 2006).

É importante salientar que a ativação dos mastócitos pela IgE induz a liberação de mediadores pré-formados como a histamina, mas também de citocinas e derivados do ácido araquidônico (Kashiwakura et al., 2012; Kim et al., 2013; Shin, 2010). Mesmo assim, os efeitos da histamina em vários processos fisiopatológicos estão bem estabelecidos, tendo papel chave em manifestações clínicas como no choque anafilático, onde induz broncoespasmo e hipotensão (Limsuwan e Demoly, 2010) e nas alergias alimentares onde provoca contração da musculatura lisa e aumento da secreção mucosa (Kim et al., 2011). Na asma, é responsável pela contração da musculatura lisa que leva a broncoconstrição e aumento da permeabilidade vascular e da produção de muco, que também ocorrem na rinite alérgica (Hirota et al., 2012) e, nas reações de hipersensibilidade cutânea está diretamente relacionada ao edema, vermelhidão e prurido que ocorrem nas reações alérgicas (Gschwandtner et al., 2013; Sipos et al., 2012)

Existem vários fármacos utilizados na terapia das doenças nas quais a histamina está envolvida. Esses fármacos incluem estabilizadores da membrana de mastócitos, antagonistas de receptores H₁ e glicocorticóides. Apesar dos benefícios os mesmos podem provocar efeitos indesejáveis importantes, especialmente quando utilizados sistemicamente ou por longos períodos (Sipos et al., 2012), o que limita sua utilização. Recentemente foram desenvolvidos fármacos antagonistas de receptores H₃ e H₄ que até o momento não são utilizados clinicamente. (Skidgel e Erdös, 2006).

Considerando-se a relação da histamina com diversas doenças, e a limitação das terapias disponíveis, a busca por novos produtos que possam diminuir ou inibir a resposta da histamina sobre os diferentes tecidos torna-se importante. Uma das alternativas é a seleção e estudo de substâncias capazes de inibir a liberação de histamina pelos mastócitos, que produziria como ação imediata uma menor disponibilidade deste mediador e conseqüente redução na ativação de seus respectivos receptores e diminuição de seus efeitos tanto nas reações de hipersensibilidade quanto nos processos inflamatórios. Tais substâncias, por atuarem na liberação de histamina, além de apresentarem efeito profilático poderiam interferir

na liberação de outros mediadores visto que a ativação e degranulação mastocitária leva à liberação de outros mediadores envolvidos na resposta alérgica, além da histamina.

A busca e o desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico podem ser feitos por vários métodos como triagem empírica, descoberta ao acaso, planejamento racional e bioprospecção de produtos de origem natural (Oliveira et al., 2008). Na última abordagem, é bem reconhecido que as plantas apresentam ampla variedade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, fato que justifica o estudo das propriedades farmacológicas das espécies vegetais bem como as possíveis utilidades terapêuticas das mesmas (Oliveira et al., 2008). Historicamente se evidenciou que a obtenção através de produtos naturais é uma abordagem promissora, pois diversos fármacos de uso clínico, como morfina, escopolamina, taxol e vincristina dentre outros foram obtidos por esse método (Bierlory, 2004). No Brasil, estudos com plantas medicinais possuem um amplo espectro de possibilidades visto que o território nacional abriga aproximadamente 23% de toda a diversidade biológica do planeta, com valor estimado em aproximadamente dois trilhões de dólares (Izique, 2002).

É pertinente ressaltar ainda que o emprego da tecnologia farmacêutica, ao mesmo tempo em que aumentou a disponibilidade de recursos terapêuticos, também elevou o custo dos mesmos. Desta forma, as condições socioeconômicas vigentes obrigam a população de baixa renda a procurar alternativas terapêuticas mais baratas, como, por exemplo, as plantas medicinais (Oliveira et al., 2008). Conforme descrito por Fabricant e Farnsworth, 2001, a Organização Mundial de Saúde estima que 65% da população mundial recorrem à medicina tradicional e às plantas medicinais como recurso terapêutico. De fato, o interesse por espécies vegetais utilizadas terapeuticamente aumentou no final do século 20 e as investigações sobre a terapia baseada no uso de plantas cresceram, inclusive nos países desenvolvidos (Kim e Song, 2012). Com relação às doenças alérgicas, a natureza crônica e o tratamento muitas vezes insatisfatório fazem com que mais de 50% da população utilize as assim denominadas terapias complementares (Li, 2011; Passalacqua, 2006). Nos Estados Unidos, o aumento do uso dessas terapias está fazendo com que os médicos busquem maior conhecimento sobre as mesmas. Nesse sentido uma pesquisa entre os alergologistas mostrou que 80% estavam interessados em conhecer mais detalhes sobre essas terapias e desses, 88% tinham interesse na fitoterapia (Li, 2011).

A seleção de espécies vegetais para estudos farmacológicos pode ser feita por várias abordagens, destacando-se a etnofarmacológica, que considera o uso popular como critério para a escolha das espécies a serem estudadas (Bierlory, 2004), frequentemente visando o isolamento e identificação dos compostos majoritários ou mais ativos ou a padronização de fitoterápicos. É importante ressaltar que muitas vezes a atividade biológica das espécies vegetais decorre do efeito sinérgico de duas ou mais substâncias encontradas em uma determinada espécie vegetal e, desta forma o composto isolado pode apresentar menor potência que determinadas frações e até mesmo que o extrato vegetal bruto (Houghton, et al., 2007; Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009). Os aspectos acima descritos, associados a uma aceitação crescente pela comunidade científica fortalecem o estudo de plantas medicinais utilizando-se o fracionamento biomonitorado por ensaios biológicos, visando a obtenção tanto do constituinte químico efetivamente responsável pela a atividade biológica desejada quanto a identificação das frações que apresentem maior atividade e possam ser utilizadas na padronização de fitoterápicos seguros e eficazes com qualidade controlada.

O estudo farmacológico detalhado dos constituintes de um vegetal, até se chegar ao composto responsável pela atividade farmacológica requer um número considerável de animais, muito tempo e grande quantidade de material vegetal. Dessa forma, a utilização de métodos *in vitro* tem sido considerada como uma alternativa aos ensaios *in vivo* (Di Stasi, 1995). Nesse sentido e baseado em estudos etnofarmacológicos, Ferreira et al., 2013 selecionaram algumas espécies vegetais para avaliar a atividade inibitória sobre a liberação de histamina em um modelo *in vitro*. Neste estudo foi verificado que o extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* (ME) inibiu em 97 e 100% a liberação de histamina induzida respectivamente pelo ionóforo A23187 e pelo composto 48/80 em mastócitos peritoneais de ratos Wistar.

Tendo como base os resultados de Ferreira et al., 2013, e utilizando o mesmo ensaio *in vitro*, o presente trabalho realizou o fracionamento biomonitorado do referido extrato tendo em vista a seleção da fração mais potente que pudesse ser útil tanto para a padronização de um fitoterápico como na identificação de potenciais compostos químicos ativos como agentes úteis no tratamento de doenças onde a histamina atua como mediador chave. Para tal, inicialmente o extrato foi submetido a partição, através da qual foram obtidas três frações: n-hexânica (P1), acetato de etila (P2) e hidroalcoólica (P3). As três frações foram avaliadas quanto à atividade inibitória sobre a liberação de histamina induzida pelo ionóforo

A23187. Adicionalmente, a fração P2, identificada como a mais importante, foi avaliada em mastócitos desafiados com composto 48/80 e posteriormente em um modelo mais específico, utilizando mastócitos sensibilizados com ovoalbumina (OVA). A liberação de histamina induzida tanto pelo composto 48/80 quanto pela OVA (nesse caso nos mastócitos sensibilizados) foi inibida pela P2.

Com base nestes resultados, a fração P2 foi fracionada através de cromatografia líquida em coluna sob pressão (*flash chromatography*), utilizando-se sílica gel como fase estacionária e misturas de solventes orgânicos em diferentes polaridades. As oito frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas em seis subfrações sendo essas denominadas de P2A a P2F. Todas as subfrações da P2 foram avaliadas quanto ao efeito inibitório sobre liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187. Dentre elas, a mais ativa foi a P2C, a qual foi selecionada para estudos em suspensão de mastócitos desafiados com composto 48/80 e demonstrou elevado efeito inibitório.

Paralelamente aos ensaios biológicos, o extrato bem como suas frações foram submetidos a análise fitoquímica. Inicialmente foi realizada uma triagem, que indicou a presença de catequinas, flavonóides, saponinas e triterpenos tanto no extrato quanto na fração P2. Posteriormente, estudos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) confirmaram a presença de terpenos e catequinas (Rodrigues-Orsi et al., 2012). Finalmente, a análise fitoquímica das frações ativas por CG/EM (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) mostrou a presença de terpenos, esteróis e ácidos graxos de cadeia longa.

Dada a extensão dos estudos realizados em diferentes aspectos, optamos em apresentar o presente estudo na forma de capítulos, considerando-se previamente que tornaria sua análise e compreensão mais fácil e agradável. Neste sentido, o presente trabalho foi subdividido nas seguintes partes:

Capítulo 1. Triagem de plantas com atividade inibitória sobre a liberação de histamina. Neste capítulo estão os principais resultados obtidos com diferentes espécies vegetais, os quais permitiram a seleção da espécie *Hymenaea stigonocarpa* para a continuidade dos estudos. Este capítulo é de fato um manuscrito enviado para a publicação junto ao BMC Complementary and Alternative Medicine e denominado “Evaluation of potential uses of Brazilian medicinal plant to treat allergic diseases using histamine release inhibition assay”.

Capítulo 2. Fracionamento do extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*. Neste capítulo estão descritos os métodos e os resultados das análises fitoquímicas realizadas com o extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* bem como das suas frações e subfrações.

Capítulo 3. Avaliação do efeito *in vitro* das frações e subfrações do extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* sobre a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato. Neste capítulo estão os resultados farmacológicos obtidos com todos os estudos realizados com as suas frações e subfrações.

Capítulo 4. Pesquisa de inibidores da secreção de histamina a partir do extrato metanólico bruto das cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa*. Este capítulo inclui a versão preliminar de um artigo para publicação, contendo os principais resultados obtidos com o fracionamento biomonitorado do extrato metanólico bruto das cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, a qual precisa ser melhorada para ser encaminhada para um bom veículo de publicação.

Capítulo 5. Considerações finais. Neste capítulo apresentamos uma discussão geral dos resultados obtidos, assim como nossas principais conclusões.

CAPÍTULO 1

Triagem de plantas com atividade inibitória sobre a liberação de histamina

**Evaluation of potential uses of Brazilian medicinal plant to treat allergic diseases
using histamine release inhibition assay**

Tarina Lins Ferreira¹, Adriano Cressoni Araujo^{1,2}, Leonardo Noboru Seito¹, Luiz Claudio Di Stasi^{1*}

¹Univ. Estadual Paulista - UNESP, Institute of Biosciences, Department of Pharmacology,
Laboratory of Phytomedicines, Botucatu, SP, Brazil.

²Univ. de Marília - UNIMAR – Department of Pharmacology, Marília, SP, Brazil.

**Corresponding author:* Luiz Claudio Di Stasi

Laboratory of Phytomedicines,

Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, Univ. Estadual Paulista (UNESP),
Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Brazil.

Phone: +55 21 14 3880 0216

Fax: +55 21 14 3815 3744

e-mail: ldistasi@ibb.unesp.br

Abstract

Background: The increase of allergic diseases has accompanied the world population growth and the major challenge is to reduce morbidity and available treatments of the allergic diseases present limitations regarding efficacy and safety. Considering the importance of histamine as main mediator in allergic diseases, we evaluated the inhibitory effects of three Brazilian medicinal plants (*Acanthospermum australe*, *Byrsonima verbascifolia* and *Hymenaea stigonocarpa*) on the histamine release from mast cells stimulated by different chemical agents in order to identify potential use of these plants as source of antiallergic products.

Methods: Seven different plant part extracts of *A. australe*, *B. verbascifolia* and *H. stigonocarpa* (0.3 to 100 mg/mL) were evaluated on the histamine release from rat peritoneum mast cells challenged or not challenged (cytotoxicity studies) by ionophore A23187 and compound 48/80. Quantification of histamine release was performed using an automatic fluorometric continuous flow system.

Results: All plant extracts produced a differential inhibitory effect on the histamine release and a concentration-dependent response was promoted by stem and leaf extracts of *B. verbascifolia* and stem bark and leaf extracts of *H. stigonocarpa*. An extraordinary effect characterized by a complete inhibition of histamine release was observed using low concentrations of *H. stigonocarpa* stem bark extract.

Conclusions: The present study supports the use of these three medicinal plants as complementary medicine and important source of new compounds to treat allergic diseases, particularly *Hymenaea stigonocarpa* that produced a complete inhibition of histamine release.

Keywords – histamine release, mast cells, antiallergenic, *Acanthospermum australe*, *Byrsonima. verbascifolia* and *Hymenaea stigonocarpa*.

Background

The increase of allergic diseases has accompanied the world population growth and the major challenge is to reduce morbidity. It has been suggested that increase in allergic disorders is related to interaction between genetics variations of the immune regulation and environmental factors like allergens, pollution, infections and alcoholic drinks [1,2]. Nowadays, available treatments of the allergic diseases, particularly glucocorticoids, antihistaminics, xanthines, β 2-adrenergic agonists and sodium cromoglycate present limitations regarding efficacy and safety. In addition, it has been proposed that effective inhibition of mast cell activation could be a better alternative for the pharmacological treatment of allergic diseases, because this procedure would inhibit the disease either during allergic sensitization or on consolidated disease with only one specific action [3]. In early events of allergic diseases, histamine plays an important role. Histamine and other endogenous mediators of allergic diseases are promptly release from mast cells and the inhibition of the effects of histamine and/or mast cells secretion has been considered as basis of therapeutic approaches used to treat allergic diseases [4]. In this way, the use of natural products including plant extracts or compounds from plant origin have been an important approach in order to obtain better management of allergic diseases [2,5]. For this reason, our laboratory has been interested in studying the potential protective effects afforded by medicinal plants against allergic diseases and a special interest has been devoted to *Acanthospermum australe*, *Byrsonima verbascifolia* and *Hymenaea stigonocarpa*, three Brazilian medicinal plants popularly used to treat allergic diseases.

Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntze. (Asteraceae) is an annual shrub widely distributed in South America, mainly in Brazil, where is known as “carrapicho” and popularly used against bronchitis, cough, skin irritation and wound healing [6,7].

Byrsonima verbascifolia (L.) Rich. ex Juss. (Malpigiaceae) is a tree with trivial name “murici” used as a popular remedy to treat skin infections, bronchitis and cough [8].

Finally, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae), a large tree popularly named as “jatobá-do-cerrado”, has been used in Brazilian folk medicine for the treatment of inflammation, cough and bronchitis [9].

Despite ethnopharmacological uses of these medicinal plants, there is no pharmacological evidence for their effects on diseases involving histamine. In this context, our objective was to investigate the inhibitory effects of *A. australe*, *B. verbascifolia* and *H. stigonocarpa* plant extracts on histamine release from mast cells induced by ionophore A23187 and compound 48/80 in order to corroborate traditional uses of these medicinal plants and to identify potential source of products useful in the management of allergic diseases.

Methods

Plant Material

Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntz and *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne were identified by the taxonomists of the Herbarium of UNESP, Bauru and deposited respectively under number 5690 and 5691, while *Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. ex Juss. was identified by taxonomists of the Herbarium Irina Delanova Gemtchujnicov of the Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu and deposited under number 24163. Stems, roots and seeds of *Acanthospermum australe*, stems and leaves of the *Byrsonima verbascifolia* and stem barks and leaves of the *Hymenaea stigonocarpa* were collected in areas of the Cerrado (Brazilian Savannah) nearby Botucatu city, State of São Paulo, Brazil.

Preparation of the plant extracts

Each part plant material was separately dehydrated on an air circulation and renewal chamber at 45°C for 48 hours. After spraying in knife grinder, 10 g of the stems, seeds and roots of *A. australe*, leaves and stems of *B. verbascifolia* and leaves and stem barks of *H. stigonocarpa* were subjected to extraction with absolute methanol (100 ml) for 48 hours for three times. Then, the resulting methanol extracts were filtered and concentrated on a rotary evaporator at 45°C up to total methanol removal. All plant extracts were resuspending in a solution of the DMSO 2% in Tyrode.

Reagents

Ionophore A23187 and compound 48/80 were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

Animals

Male Wistar rats weighing 200-300 g from the Central Animal House of UNESP Botucatu were used in the experiments. The animals underwent an acclimatization period of one week in the Animal House of the Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, had free access to food and water and were kept in standardized conditions (21 °C, 60-70% humidity and light / dark cycle 12 hours). All experiments were conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care, and all the experimental protocol was approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Obtaining cell suspensions

After rats euthanasia and rear section of large vessels and cervical vertebrae, 40 ml of Tyrode (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.4mM NaHPO₄, 12mM NaHCO₃ and 5.6mM glucose) pH7.4 added with heparin (5 units/ml) were injected into the peritoneal cavity of the animals. Then, the peritoneal fluid was filtered in gaze, centrifuged (150x g for 5 min at 22 °C) and washed two times with Tyrode solution. After the third centrifugation, the wash was resuspended in Tyrode to perform *in vitro* treatments.

***In vitro* treatments**

The mast cell suspension was incubated in a water bath at 37 °C for 5 minutes and then separated into aliquots of 500 ml. For *in vitro* treatment experimental groups (n = 5) were as follows: a. Cell suspensions without treatments, which mast cell suspensions were incubated for 20 minutes in order to evaluate plant citotoxicity; b. Cells suspensions treated with plant extracts, which mast cells suspensions were incubated for 20 minutes containing 50 ml of the methanol extract of plant species at concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 and 100 µg/ml, c. ionophore A23187 group, which mast cell suspensions were incubated for 10 minutes with 50 ml of the methanol extracts (concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 and 100 µg/ml), stimulated with 20ml of ionophore A23187at 3 mM and incubated for another 10 minutes; d. compound 48/80 group, which mast cell suspensions were incubated for 10 minutes with 50 ml of the methanol extracts (concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 and 100 µg/ml), stimulated with 20 ml of compound 48/80 at 0.5 mg/ml and incubated for another 10 minutes. In all groups, after incubation period, histamine release was stopped with 1.0 ml cold Tyrode's solution.

Determination of histamine release

After treatments, the suspensions were centrifuged (150x g for 5 min at 4°C). Supernatants were transferred to another tube and the pellets resuspended in 1.5 ml of Tyrode solution. At the end were added 50 µl of 70% perchloric acid in all tubes. The dosage of histamine was performed using the fluorimetric method and the percentage of histamine release was calculated by comparing the concentration of the precipitate (intracellular) and supernatant (extracellular).

Statistical Analysis

The results were expressed as percentage of histamine release (mean ± S.E.M.) and evaluated by analysis of variance (ANOVA) supplemented with Dunnett's test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Effect vehicle and plant extracts on the spontaneous histamine release (cytotoxicity assay)

Vehicle (DMSO 0.2% in Tyrode) and plant extracts in all concentrations did not alter the spontaneous release of histamine from mast cell suspension (data not shown).

Inhibition by *Acanthospermum australe* extracts of induced histamine release in rat peritoneal mast cells.

The stem extract of *A. australe* at concentrations of 10, 30 and 100 mg/ml significantly inhibited 62, 58 and 91% histamine release induced by ionophore A23187, respectively (Fig.

1). When mast cells were stimulated by compound 48/80, stem bark extract showed a concentration-dependent inhibitory effect at concentrations of 3, 10 and 30 mg/ml (Fig. 1).

Seed extract of *A. australe* inhibited histamine release induced by both ionophore A23187 and compound 48/80 at concentrations from 0.3 mg/ml (Fig. 2). Interestingly, treatment with 100 mg/mL of seed methanol extract increased histamine release induced by compound 48/80 when compared to mast cell without treatment (Fig. 2).

Finally, root extract of *A. australe* was able to inhibit histamine release induced by compound 48/80 (Fig. 3). No inhibitory effects were observed with this treatment on the histamine release induced by ionophore A23187 (Fig. 3).

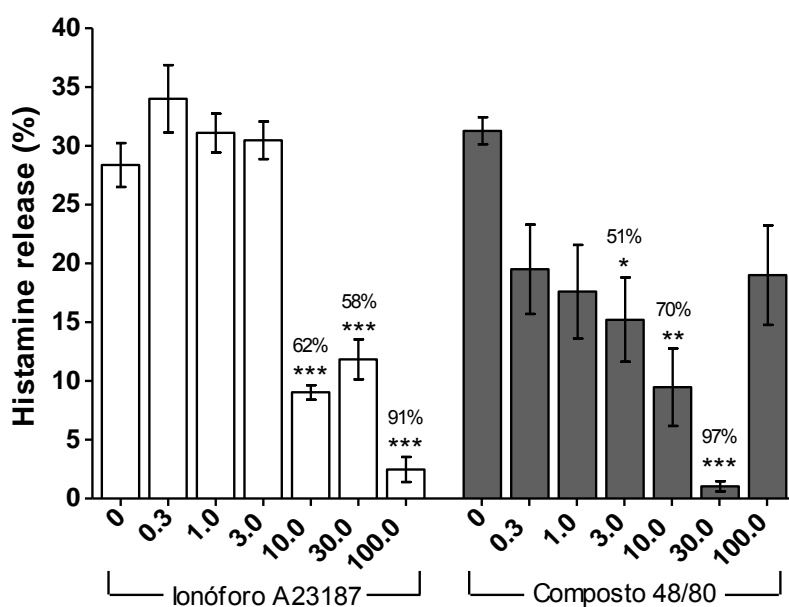


Fig 1. Effect of stem extract of *A. australe* (µg/ml) on histamine release (mean ± S.E.M.) induced by ionophore A23187 (3 µM) or compound 48/80 (0.5 µg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats (n=4). The percentage indicates the inhibition of histamine release. *p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001

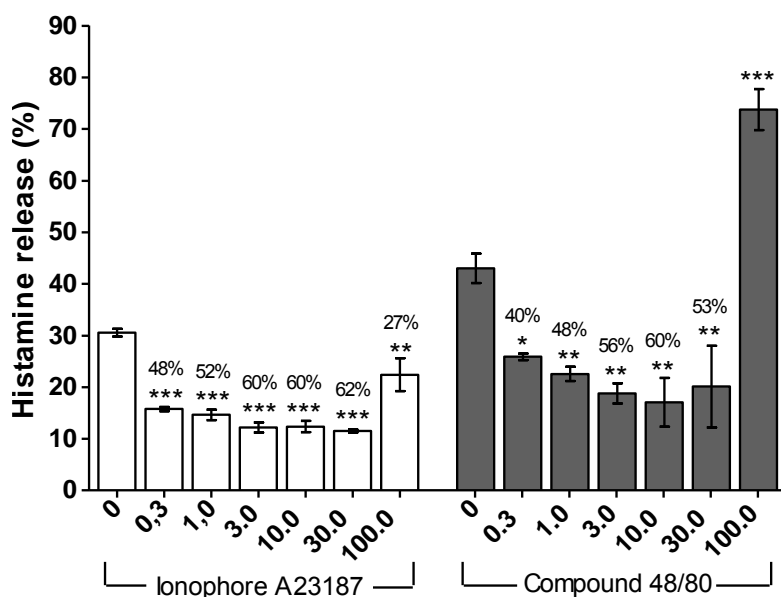


Fig 2. Effect of seed extract of *A. australe* (µg/ml) on histamine release (mean ± S.E.M.) induced by ionophore A23187 (3 µM) or compound 48/80 (0.5 mg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats (n=4). The percentage indicates the inhibition of histamine release. *p<0.05; **p<0,001; ***p<0.0001

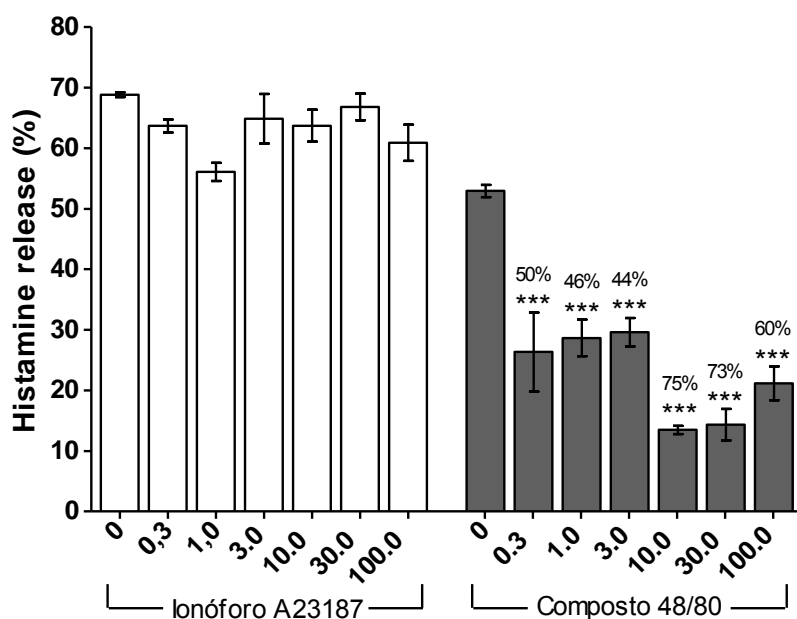


Fig. 3. Effect of root extract of *A. australe* (µg/ml) on histamine release (mean ± S.E.M.) induced by ionophore A23187 (3 µM) or compound 48/80 (0.5 mg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats (n=4). The percentage indicates the inhibition of histamine release. **p<0,001; ***p<0.0001

Inhibition by *Byrsonima verbascifolia* extracts of induced histamine release in peritoneal mast cells

Effects of leaf extract of *B.verbascifolia* on the histamine release induced by ionophore A23187 was observed after treatment with 10, 30 and 100 mg/ml, which inhibited histamine release by 10, 50 and 90%, respectively, showing a concentration dependent inhibitory effect (Fig. 4). At concentrations of 1, 3, 10, 30 and 100 mg/ml, leaf extract significantly inhibited histamine release induced by compound 48/80 by 26, 75, 81, 91 and 100%, respectively, (Fig. 4). The stem extract of *B.verbascifolia* at concentrations of 0.3 and 1 mg/ml was able to inhibit the histamine release induced by ionophore A23187 in 24 and 10%, respectively. However, a concentration-dependent inhibitory effect on histamine release induced by compound 48/80 was observed from 0.3 mg/ml (Fig. 5).

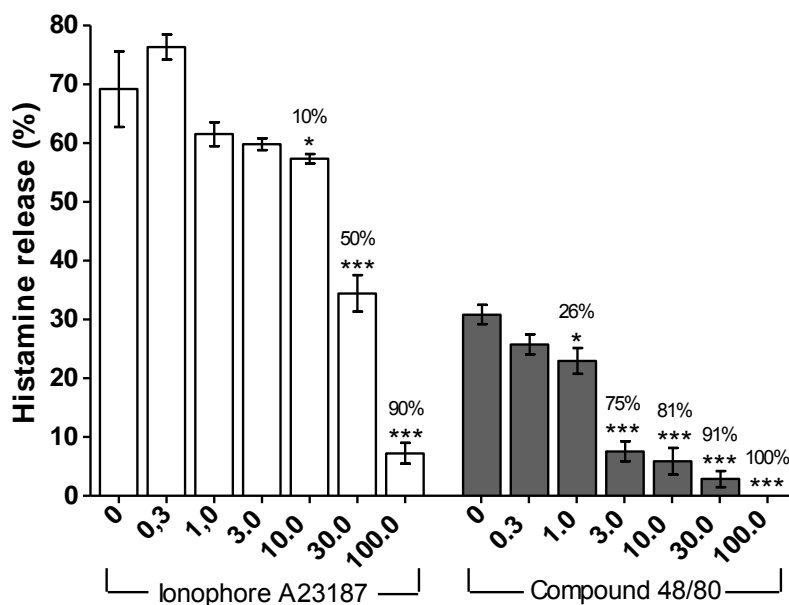


Fig. 4. Effect of leaf extract of *B. verbascifolia* ($\mu\text{g/ml}$) on histamine release (mean \pm SEM) induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) or compound 48/80 (0.5 mg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n=4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p<0.05$; *** $p<0.0001$

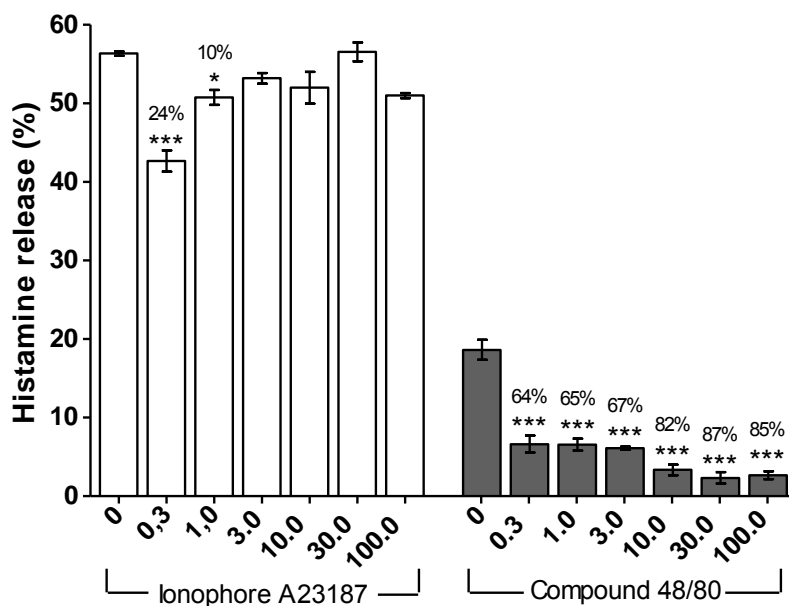


Fig. 5. Effect of stem extract of *B. verbascifolia* ($\mu\text{g/ml}$) on histamine release (mean \pm SEM) induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) or compound 48/80 (0.5 mg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n=4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p<0.05$; *** $p<0.0001$

Inhibition by *Hymenaea stigonocarpa* extracts of induced histamine release in rat peritoneal mast cells.

As shown in Figure 6, the stem bark extract of *H. stigonocarpa* (30 and 100 mg/ml) significantly inhibited 78 and 97% histamine release induced by ionophore A23187, respectively. When mast cells were stimulated by compound 48/80, stem bark extract was able to inhibit the histamine release from lower concentration. At concentration 10 mg/ml and below, the histamine inhibition was 100% (Fig. 6). At concentrations of 30 and 100 mg/ml, leaf extract of *H. stigonocarpa* significantly inhibited histamine release induced by ionophore A23187 by 54 and 97%, respectively (Fig. 7). When the mast cells were stimulated by compound 48/80, the leaf extract significantly inhibited histamine release from concentration of 1 mg/ml, with a complete inhibition at concentrations of 30 and 100 mg/ml (Fig. 7).

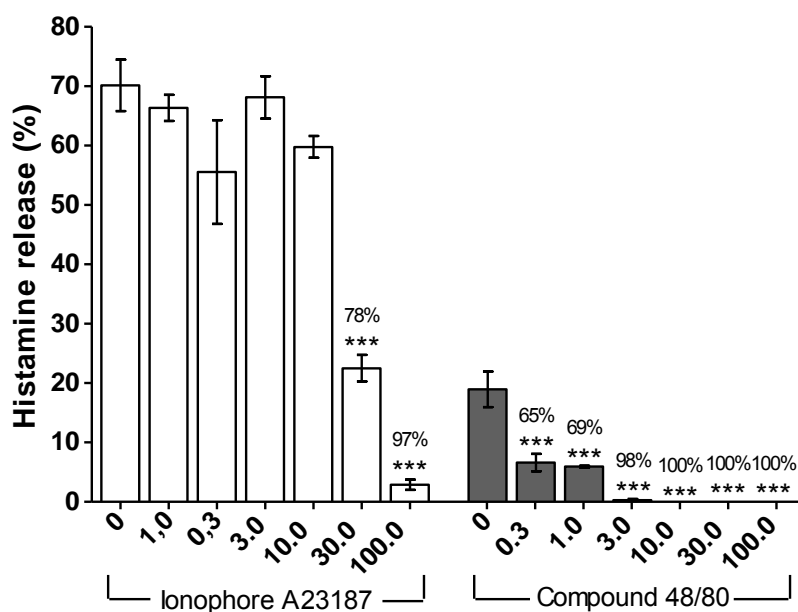


Fig. 6. Effect of stem bark extract of *H. stigonocarpa* (µg/ml) on histamine release (mean ± SEM) induced by ionophore A23187 (3 µM) or compound 48/80 (0.5 mg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. *** $p < 0.0001$

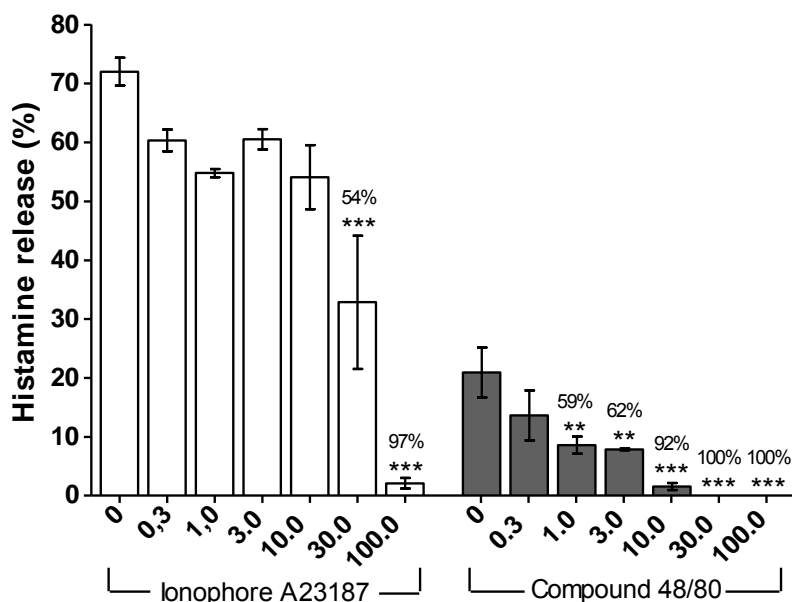


Fig. 7. Effect of leaf extract of *H. stigonocarpa* (µg/ml) on histamine release (mean ± SEM) induced by ionophore A23187 (3 µM) or compound 48/80 (0.5 mg/ml) in rat peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

Discussion

The release of histamine by mast cells is a key event for the development of the allergic reactions; hence inhibition the secretion of mast cells can be useful in treating these diseases. Based on this, we evaluated effects of different medicinal plants on the histamine release from rat peritoneal mast cells. Since mast cells exhibit differential response to inductors or inhibitors of secretion, we used two different chemical inductors (ionophore A23187 and compound 48/80), which acts by distinct mechanisms. We evaluated the inhibitory effects of seven distinct plant extracts obtained from three medicinal plants popularly used to treat allergic diseases. Our results demonstrated, for the first time, that *A. australe*, *B. verbascifolia* and *H. stigonocarpa* extracts showed strong inhibitory activity of histamine release induced by different agents and represent potential therapeutic resource to treat allergy and other diseases involving histamine.

In previous studies using the same experimental assay, we investigated the inhibitory effects of classical inhibitors of histamine release (sodium cromoglycate, theophylline and quercetin) on the rat peritoneum mast cells stimulated by ionophore A23187 [5]. Our previous results showed that sodium cromoglycate at concentration 3, 10 and 30 mM was unable to inhibit histamine release. Sodium cromoglycate prevents the release of histamine and other autacoids from mast cell, allegedly acting as mast cell stabilizer and blocking calcium mobilization [10,11]. In this way, the inhibitory effects on the histamine release promoted by the stem and seed extracts of *A. australe*, leaf extract of *B. verbascifolia* and, stem bark and leaf extracts of *H. stigonocarpa* were more potent than inhibitory effects produced by sodium cromoglycate [5]. Moreover, considering that the content of active compounds of the plant extract responsible for the histamine inhibition is below 30 mg/mL, it is plausible also suggest that plant extracts could have similar or better potency than quercetin and theophylline used in same concentration in our previous studies [5].

Quercetin exhibits inhibitory effect on histamine release induced by IgE [10,12] and inhibits the increase of intracellular calcium when mast cells are challenged with ionophore A23187 [13]. Interestingly, it has demonstrated that inhibition of protein kinase C which could explain the inhibitory effect of quercetin and other natural flavonoids when mast cells are challenged with compound 48/80 [13]. Quercetin has been considered more effective than sodium cromoglycate in blocking human mast cell cytokine release [10]. Additionally, theophylline, a drug widely used to treat asthma, produce a nonspecific inhibition of phosphodiesterase enzyme with consequent accumulation of intracellular cAMP and increase of intracellular calcium, besides to acting as potent inhibitor of adenosine receptors, with antagonistic action towards A1- and A2-receptors [14].

Do date no one had evaluated the effects of *A. australe*, *B. verbascifolia* and *H. stigonocarpa* on histamine release from mast cells and despite of these plants are commonly and popularly used to treat several diseases involving histamine, no previous findings support the inhibitory effects here determined. On the other hand, possible compounds responsible for the potent inhibitory effects of these three medicinal plants include some candidates. Phytochemical studies identified the presence of several flavonoids, diterpenes and sesquiterpene lactones, alkaloids and tannins in *A. austral* [15,16]; triterpenes, phenolic compounds as resveratrol, ferulic acid and flavonoids in *B. verbascifolia* [17,18] and flavonoids, tannins and sesquiterpenes in *H. stigonocarpa* [19,20]. Several studies have been shown that flavonoids inhibit histamine releases from mast cells stimulated by ionophore A23187 as well as inhibit protein kinase C [13,21]. Interestingly, several terpenes also decrease release of histamine induced by different secretagogues, particularly ionophore A23187 and compound 48/80 [22-24]. Among these compounds, flavonoids and terpenes are common class of secondary metabolites detected in all plants studied in this present study. In this way, it is plausible suppose that these compounds are responsible for the inhibitory activity on histamine release.

The difference between the percentages of inhibition obtained with the different extracts could be explained by different concentrations of the constituents present in each of them.

The compound 48/80 acts by binding to G protein-coupled receptors on the surface of mast cells leading, via phospholipase C and D, enhances the activity of the protein tyrosine kinase C with consequent increase in intracellular calcium influx and mast cell degranulation [25]. It has been reported that compound 48/80 increase permeability of the lipid bilayer membrane by causing a perturbation of the membrane [26]. This result indicates that membrane permeability increase may be essential trigger for the release of the mediator from mast cells. On the other hand, ionophore A23187 acts as a calcium carrier from extracellular into the intracellular environment, as well as increases calcium release by organelles [3]. Based on this, a change in the availability of intracellular calcium could be also related in the mechanism of action of the plant extracts able to inhibit histamine release induced by ionophore A23187 and compound 48/80. In addition, inhibitory effect on the histamine release induced by compound 48/80 could be related to capacity of plant extracts acts on the lipid bilayer membrane affecting the prevention of the perturbation being induced by compound 48/80. Indeed, it is very important to note that all plant extracts were assessed to identify possible interferences in the secretion of mast cells of the rat peritoneum and no effects were observed on histamine release in our experimental conditions, suggesting that medicinal plant extracts promote no cytotoxicity on mast cells.

Finally, a comparative analysis of the inhibitory effect on histamine release form mast cells produced by seven different plant extracts allows some important considerations. First, *A. australe* plant extracts were able to similarly inhibit histamine release induced both ionophore A23187 and compound 48/80, except for the root extract that only inhibited histamine release induced by compound 48/80. Second, both *B. verbascifolia* extracts produced a concentration-dependent inhibitory effect on histamine release induced by compound 48/80, but only the

leaf extract produced a concentration-dependent inhibition on histamine release induced by ionophore A23187. Third, a potent inhibitory effect concentration-dependent was demonstrated for the *H. stigonocarpa* extracts on the histamine release induced for both ionophore A23187 and compound 48/80. In fact, stem bark and leaf extracts inhibited 100% histamine release induced by compound 48/80 from concentration of 10 and 30 µg/mL, respectively. Bio-monitored fractionation of this plant extract using the same assay is in progress in our laboratory.

Conclusion

In this study, we investigated several medicinal plants traditionally used to treat allergic disease and focused our study on their inhibitory effect against histamine release from mast cells challenged by different secretagogues, ionophore A23187 and compound 48/80. On the basis of our results, the present study support the therapeutic potential of *Acanthospermum australe*, *Byrsonima verbascifolia* and *Hymenaea stigonocarpa* plant extracts in the prevention and treatment of diseases involving histamine, particularly allergic diseases. Additionally, our study clearly corroborates the traditional uses of these medicinal plants to treat allergic diseases, opening new possibilities for future anti-allergic herbal products, particularly using *Hymenaea stigonocarpa* that produced a complete inhibition of histamine release.

Competing interests

The authors declare that they have no financial and non-financial competing interests.

Authors' contributions

TLF, ACA and LNS carried out the study, data collection and analysis. LCDS designed the study, supervised in vitro bioassays and data analysis. All authors prepared the draft of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The study was partially supported by grants from Fapesp (São Paulo Research Foundation) and CAPES (Brazilian Ministry of Education). We thank the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) - Brazilian Ministry of Science and Technology for a fellowship to L.C. Di Stasi.

Author details

¹Laboratory of Phytomedicines, Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo CEP 18618-970, Brazil. 2 University of Marília - UNIMAR – Department of Pharmacology, Marília, SP, Brazil

References

1. Busse WW: **The role of allergy in disease.** *Immunol Rev* 2011, **242**: 5-9.
2. Magrone T, Jirillo E: **Influence of polyphenols on allergic immune reactions: mechanisms of action.** *Proc Nutr Soc* 2012, **71**: 316-321.
3. Gomes JC, Di Stasi LC, Sgarbosa F, Barata LES: **Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchietia salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig.** *Int Arch Allergy Imm* 1994, **103**:188-193.
4. Metcalfe DD, Boyce JA: **Mast cell biology in evolution.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, **117**: 1227-1229.
5. Oliveira DMC, Luchini AC, Seito LN, Gomes JC, Crespo-López ME, Di Stasi LC: ***Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species.** *J. Ethnopharmacol* 2011, **135**: 463-468.
6. Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA: *Medicinal plants from Brazil.* Algonac, Ref Publications, Inc., 2000.

7. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz M, Tien OS, Kakinami SH, Reis MS: **Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest.** *Fitoterapia* 2002, **73**: 69-91.
8. Rodrigues VEG, Carvalho DA: *Plantas medicinais no domínio dos cerrados.* UFLA Ed., Lavras, 2001.
9. Pott A, Pott VJ: *Plantas do Pantanal.* Embrapa-SP Ed., Corumbá, 1994.
10. Weng Z, Zhang B, Asadi S, Sismanopoulos N, Butcher A, Fu X, Katsarou-Katsari A, Antoniou C, Theoharides T: **Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans.** *PloSOne* 2012, **7**: 1-10.
11. Shin HY, Kim JS, An NH, Park RK, Kim HM: **Effect of disodium cromoglycate on mast cell-mediated immediate-type allergic reactions.** *Life Sci* 2004, **74**: 2877-2887.
12. Lee EJ, Ji GE, Sung MK: **Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells.** *Inflamm Res* 2010, **59**: 847-854.
13. Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, Boucher W, Cao J, Papadopoulou N, Cetrulo CL, Theoharides TC: **Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells.** *Brit J Pharmacol* 2005, **145**: 934-944.
14. Page CP: **Recent advances in our understanding of the use of theophylline in the treatment of asthma.** *J Clin Pharmacol* 1999, **39**: 237-240.
15. Sánchez M, Kramer F, Bargardi S, Palermo JA: **Melampolides from Argentinean *canthospermum australe*.** *Phytochem Lett* 2009, **2**: 93-95.
16. Bohlmann F, Jakupovic J, Dhar AK, King RM, Robinson H: **Two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*.** *Phytochem* 1981, **20**:1081-1083.

17. Gottlieb OR, Mendes PH, Magalhães MT: **Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*.** *Phytochem* 1975, **14**: 1456.
18. Malta LG, Ghiraldini FG, Reis R, Oliveira MDV, Silva LB, Pastore GM: ***In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals.** *Food Res Int* 2012, **49**: 604-611.
19. Rodrigues Orsi P, Bonamin F, Severi JA, Santos RC, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, DI Stasi LC: ***Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: a Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models.** *J. Ethnopharmacol* 2012, **143**(1): 81-90.
20. Marin SS, Langenhein JH: **Biosynthesis of sesquiterpenes in *Hymenaea* inferred from their quantitative co-occurrence.** *Phytochem* 1976, **15**: 113-119.
21. Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TSK, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyum MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH: **Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells.** *Arch Pharm Res* 2008, **31**: 1303-1311.
22. Park KH, Park J, Koh D, Lim, Y: **Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma.** *Phytother Res* 2002, **16**: 359-363.
23. Silva LL, Gomes BS, Souza-Neto BP, Oliveira JPC, Ferreira ELF, Chaves MH, Oliveira FA: **Effects of *Lecythispisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus.** *J. Ethnopharmacol* 2012, **139**: 90-97.
24. Hong J, Aoyama S, Hirasawa N, Zee O, Ishihara K, Hashida C, Kimura M, Seyama T, Ohuchi K: **Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide.** *Planta Med* 2011, **77**: 252-256.

25. Palomäki VAB, Laitinen JT: **The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT1A receptors in rat brain sections.** *Brit J Pharmacol* 2006, **147**: 596-606.
26. Shibata H, Mio M, Tasaka K: **Permeability increase in black lipid membrane induced by compound 48/80.** *Biochim Biophys Acta* 1984, **805**:127-130.

CAPÍTULO 2

**Fracionamento do extrato metanólico bruto
da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa***

1 – Material e método

1.1 – Reagentes e materiais

Os solventes de grau analítico (PA) utilizados nas etapas de preparo, prospecção fitoquímica qualitativa e determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) foram obtidos da Synth e Vetec. Solventes de grau HPLC utilizados na etapa de caracterização dos perfis cromatográficos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram adquiridos da Tedia. Água deionizada foi purificada no local, em deionizador de água Ação Científica.

Padrões analíticos e reagentes utilizados para preparação de reveladores de cromatoplas e análises por CG/EM foram adquiridos da Sigma Aldrich, Merck, Mallinckrodt e Vetec.

Lâmpada de iluminação no ultravioleta utilizada para inspeção das placas cromatográficas nos comprimentos de onda 254 e 360 nm foi obtida da Chromatovue

Placas comerciais de sílica gel 60 (Whatman[®]) com e sem indicador de fluorescência, de tamanho 20 × 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente foram empregadas nas etapas de análise por CCD.

A vidraria utilizada nas análises por CG/EM foi previamente imersa em detergente alcalino Extran 5% (Merck) por 4h, sendo em seguida enxaguada exaustivamente com água corrente, água deionizada, acetona e metanol. Após lavagem, a vidraria não-volumétrica foi seca em estufa, enquanto que a volumétrica foi seca ao ar, sendo posteriormente mantidas em armário fechado.

1.2 - Material Vegetal

1.2.1. Coleta e processamento pós-coleta

Casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* foi coletada na Região de Botucatu/SP no período de março de 2009 acondicionada em sacos de polietileno e levada imediatamente ao Laboratório de Fitomedicamentos no Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu.

Posteriormente, o material vegetal foi selecionado de acordo com a coloração, tamanho. As partes selecionadas da casca foram desidratadas por 72 horas em estufa com circulação e renovação de ar à temperatura de 45°C, trituradas em moinho de faca e o material resultante foi utilizado para preparo dos extratos.

Material vegetal florido foi coletado para a montagem de exsicata e identificado junto ao Herbário da UNESP de Bauru sob número 5.691.

1.2.2. Preparo do extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* (EM)

690 g do material triturado foram submetidas a processo de maceração a frio em 1,0 litro de metanol absoluto por um período de 48 horas por três vezes consecutivas. As soluções extrativas foram filtradas em papel de filtro, concentradas em evaporador rotativo a 45°C, levadas a secura completa em estufa de ar circulante a 25°C e o extrato resultante armazenado em câmara fria.

1.2.3. Fracionamento do EM

100,0 g do EM foram dissolvidos em 1500 mL de metanol/água (1:1), resultando em um extrato hidroalcoólico.

Em seguida, o extrato hidroalcoólico foi fracionado através de partição com 450 mL de n-hexano por três vezes consecutivas. A fração hexânica (P1) resultante foi concentrada em evaporador rotativo a 45°C. Em seguida a partição hidroalcoólica foi concentrada até aproximadamente metade do volume e particionada com 250 mL de acetato de etila por cinco vezes consecutivas. As frações acetato de etila (P2) e hidroalcoólica (P3) resultantes foram concentradas em evaporador rotativo a 45°C e levadas a secura completa em estufa com circulação de ar a 25°C. Todas as frações foram armazenadas em câmara fria.

1.2.4. Fracionamento da fração acetato de etila (P2)

Das três frações avaliadas, a P2 foi a que apresentou maior atividade inibitória sobre a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187 e por isso foi avaliada em

mastócitos desafiados com composto 48/80, também demonstrando atividade inibitória significativa. Devido a isso, foi fracionada através de cromatografia em coluna sob vácuo (CLV). Para tal, 4,0 g da P2 foram eluídas com solventes de diferentes polaridades em coluna (5 cm de diâmetro interno e 1,4 metros de comprimento) empacotada com 95 g de sílica gel G (partículas de 0,05 a 0,2mm Merck®). As subfrações resultantes foram concentradas em evaporador rotativo a 45°C e levadas à secura total em estufa a 25°C. Para eluição foram utilizados: 1000 mL de n-hexano, 500 mL de n-hexano/acetato de etila (9:1), 500 mL de n-hexano/acetato de etila (8:2), 500 mL de n-hexano/acetato de etila (7:3), 500 mL de n-hexano/acetato de etila (1:1), 1000 mL de acetato de etila, 1000 mL de acetato de etila/metanol (1:1) e 1000 mL de metanol.

As subfrações da P2 foram monitoradas por CCD, conforme descrito no item 1.3.2 e agrupadas em seis subfrações sendo:

- hexânica, denominada P2A;
- hexano/acetato de etila (9:1), denominada P2B;
- hexano/acetato de etila (8:2) + hexano/acetato de etila (7:3), denominada P2C;
- hexano/acetato de etila (1:1), denominada P2D;
- acetato de etila, denominada P2E e
- acetato de etila/metanol (1:1) + metanol, denominada P2F.

1.3 – Avaliação fitoquímica do EM, frações e subfrações

1.3.1 – Triagem fitoquímica do EM e da P2

A avaliação qualitativa das principais classes de constituintes vegetais foi realizada conforme metodologia descrita por Mattos, 2009 e Wagner et al, 1984.

1.3.2 – Avaliação do perfil cromatográfico do EM, das frações e subfrações por CCD

O perfil cromatográfico foi avaliado através de CCD, utilizando-se sílica Gel GF como fase estacionária e revelação com anisaldeído sulfúrico e posterior visualização em luz ultravioleta. O EM e as frações P1, P2 e P3 foram eluídas com acetato de etila e as subfrações da P2 com n-hexano/acetato de etila (7:3).

1.3.3 – Avaliação do perfil cromatográfico das subfrações da P2 por CG/EM

As subfrações provenientes do fracionamento da P2 foram convenientemente derivatizadas com trimetilsildiazometano, secas e redissolvidas (500 µg/mL em *n*-hexano) para caracterização por CG/EM sob condições previamente otimizadas. A programação de temperatura da coluna foi otimizada em: 50 °C por 2 minutos, aquecimento de 50 a 250 °C (5°C / minuto), permanecendo 5 minutos nesta temperatura. As temperaturas do injetor, linha de transferência e fonte de íons foram mantidas em 200 °C, 250 °C e 200°C, respectivamente. A ionização foi feita por impacto eletrônico (EI), com 70 eV de energia de ionização e o analisador foi do tipo quadrupolo. O monitoramento foi feito no modo scan (1 scan/seg), com faixa de aquisição *m/z* 45-600. A aquisição dos cromatogramas foi iniciada após 3,5 min. O gás de arraste utilizado foi Hélio (99,999% puro) à uma pressão de 100 kPa e vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL, no modo splitless (1 min), seguido de split (1:50).

A identificação tentativa dos compostos foi feita por meio da interpretação dos espectros de massas dos picos registrados e comparação com os da biblioteca NIST. Adicionalmente, também foram determinados experimentalmente os valores de “Índice de Kovats” (IK) e “Índice de Retenção Linear” (IRL) dos compostos presentes nas frações e estes comparados aos dados encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade. Para isso, uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C₇ a C₃₀) foi co-injetada e analisada nas mesmas condições experimentais anteriormente descritas. Posteriormente os valores de IK e IRL dos picos foram calculados (Kovats, 1965; Van Del Dool e Kratz, 1963).

2 - Resultados

2.1 – Rendimento dos processos de preparo e fracionamento do EM

A tabela 1 mostra os rendimentos absoluto e relativo da obtenção do EM e suas frações.

Tabela 1: Rendimentos absoluto e relativo da obtenção do EM e suas frações

Quantidades utilizadas	Solvente utilizado	Rendimento absoluto (g)	Rendimento relativo (%)
690 g de material vegetal	Metanol	155,4 g de EM	22,5
100 g de EM dissolvidos em metanol/água	n-hexano	3,2	3,2
	Acetato de etila	25,4	25,4
	Metanol/água	62,2	62,2
4,0 g de P2	n-hexano	0,041	1,025
	n-hexano/acetato de etila (9:1)	0,061	1,525
	n-hexano/acetato de etila (8:2)	0,058	1,45
	n-hexano/acetato de etila (7:3)	0,056	1,4
	n-hexano/acetato de etila (1:1)	0,081	2,025
	Acetato de etila	1,102	27,55
	Acetato de etila/metanol (1:1)	2,209	55,22
	Metanol	0,116	2,9

2.2 – Triagem fitoquímica do EM e da P2

A tabela 2 mostra os grupos de metabólitos secundários identificados na triagem fitoquímica do EM e da P2.

Tabela 2: Grupo de metabólitos secundários identificados na triagem fitoquímica do EM e da P2.

Grupo	EM	P2
Catequinas	+	+
Glicosídeo cianogênico	-	-
Alcalóides	-	-
Flavonóides	+	+
Cumarinas	-	-
Antraquinonas	-	-
Saponinas	+	+
Triterpenos	+	+

2.3 – Avaliação do perfil cromatográfico do EM, das frações e das subfrações por CCD.

A figura 1 mostra o perfil cromatográfico do EM e das frações P1, P2 e P3. A figura 2 mostra o perfil cromatográfico das subfrações da P2.

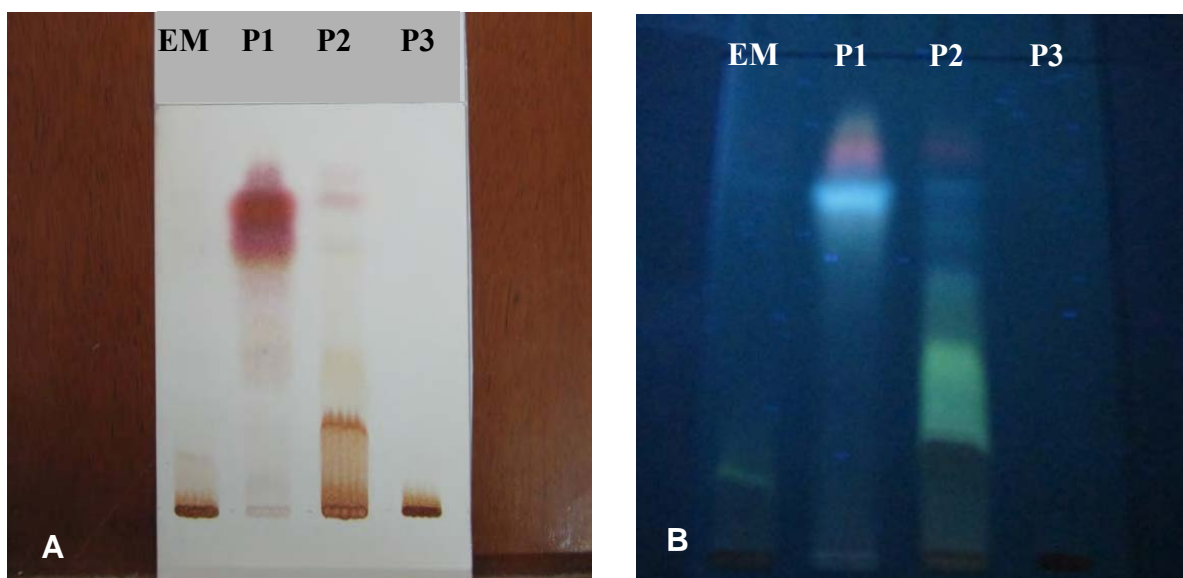


Figura 1: Cromatografia em camada delgada do EM, P1, P2 e P3 após eluição com acetato de etila em placa de sílica gel GF e revelação com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (A) e posterior visualização em luz ultra-violeta (B).

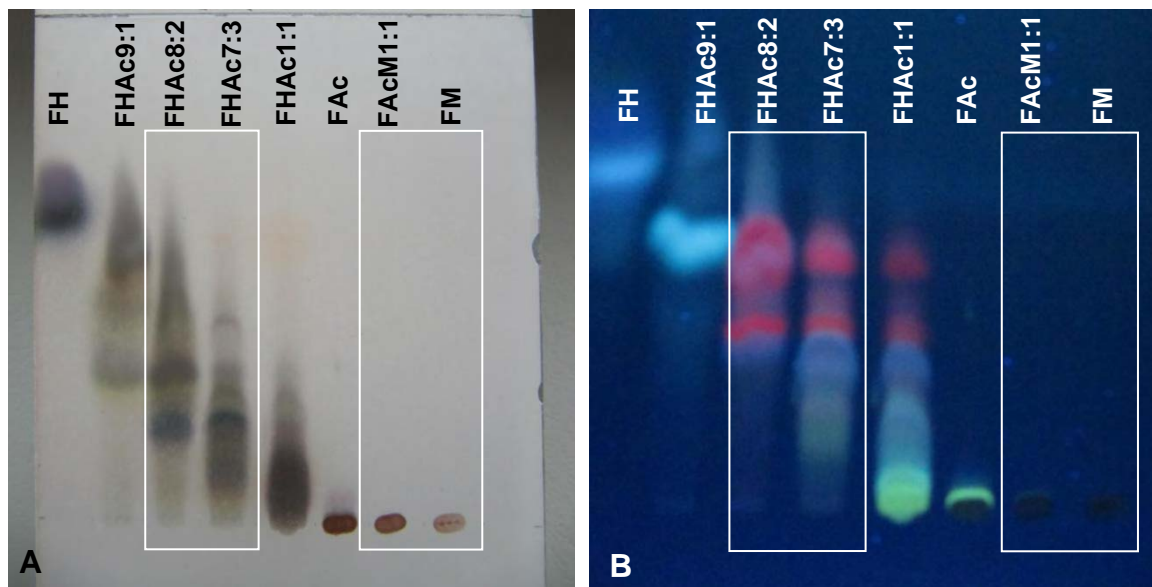


Figura 2: Cromatografia em camada delgada das subfrações da P2 após eluição com hexano/acetato (7:3) em placa de sílica gel GF e revelação com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento em estufa a 100°C (A) e leitura em luz ultravioleta (B). Frações: hexânica (FH); n-hexano/acetato de etila 9:1 (FHAc9:1); n-hexano/acetato de etila 8:2 (FHAc8:2); n-hexano/acetato de etila 7:3 (FHAc7:3); n-hexano/acetato de etila 1:1 (FHAc1:1); acetato de etila (FAC); acetato de etila/metanol 1:1 (FAcM1:1) e metanólica (FM).

2.4 – Avaliação fitoquímica das subfrações da P2 por CG/EM

A análise do perfil fitoquímico das subfrações da P2 por CG/EM mostrou a presença de terpenos (diterpenos, sesquiterpenos, fitosteróis e alguns terpenos com subgrupo não identificado) e de ácidos graxos de cadeia longa (que devido a derivatização estão decritos como éster metílico de ácido carboxílico de cadeia longa). A figura 3 e a tabela 3 mostram respectivamente o perfil cromatográfico e a relação dos compostos identificados na subfração P2A. A figura 4 e a tabela 4 mostram o perfil cromatográfico e os compostos identificados na subfração P2B. A subfração P2C foi analisadas separadamente como subfração n-hexano/acetato 8:2 e hexano acetato 7:3. A figura 5 mostra o cromatograma obtido na análise da subfração n-hexano/acetato de etila 8:2. A tabela 5 mostra os compostos identificados na subfração n-hexano/acetato de etila 8:2. Da mesma forma, a figura 6 e a tabela 6 mostram respectivamente o perfil cromatográfico e os compostos identificados na subfração n-hexano/acetato de etila 7:3. As subfrações P2D e P2E são constituídas de compostos de maior polaridade e, mesmo após derivatização não foi possível analisá-las por CG/EM.

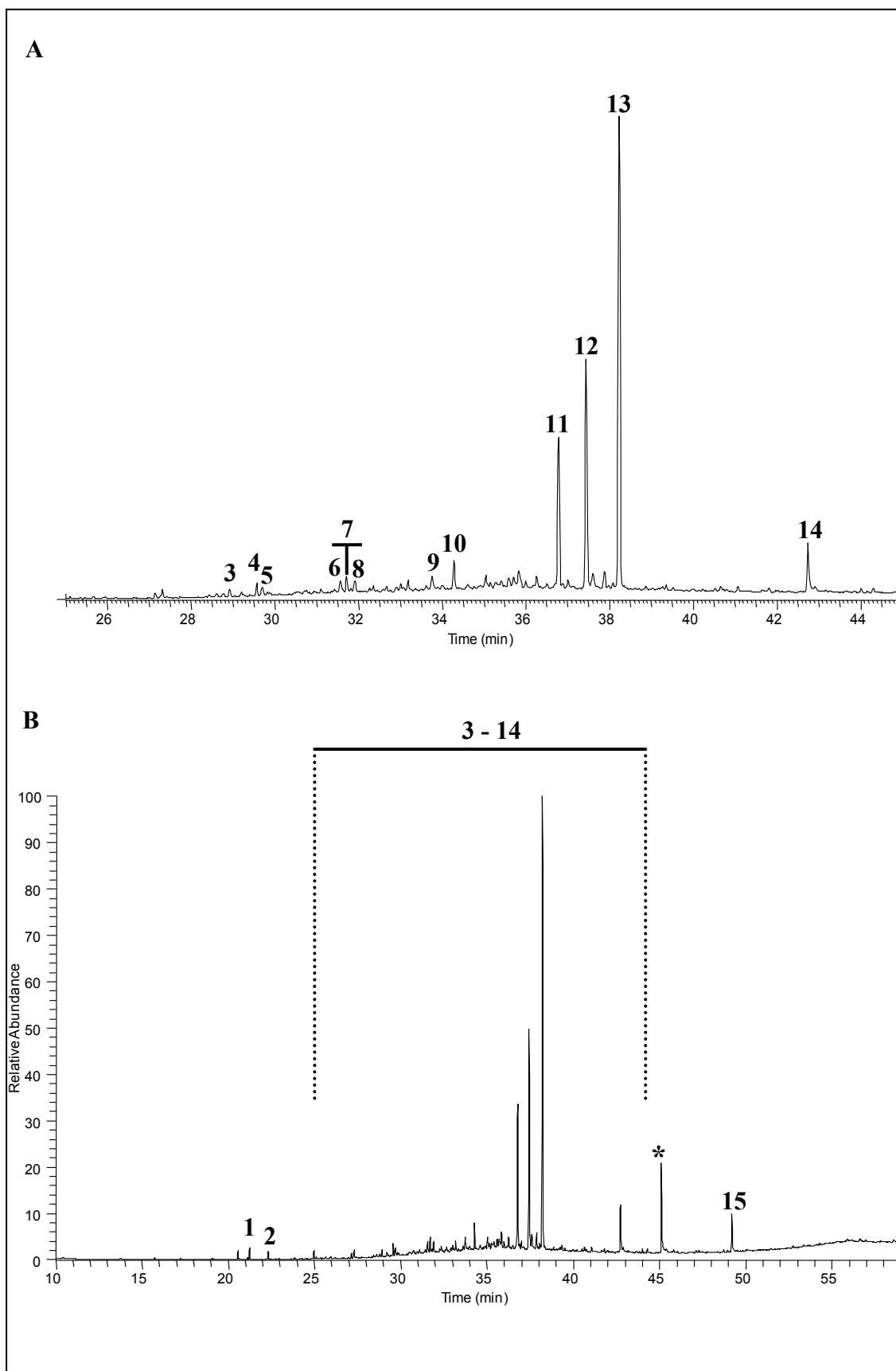


Figura 3: Perfil cromatográfico obtido após derivatização e análise da subfração P2A por CG/EM (B) e expansão na região de tempo de retenção 25-45 min (A). (*) interferente

Tabela 3: Compostos identificados no cromatograma da subfração P2A.

Pico	t _r (min)	Nome	classe	FM	PM
1	21,24	α-muuroleno	b)	C ₁₅ H ₂₄	204
2	22,33	γ-muuroleno	b)	C ₁₅ H ₂₄	204
3	28,77	Viridifloreno	b)	C ₁₅ H ₂₄	204
4	29,57	Heptadecano	d)	C ₁₇ H ₃₆	240
5	29,71	NI	d)	-	-
6	31,56	1-nonadeceno	d)	C ₁₉ H ₃₈	266
7	31,71	Octadecano	d)	C ₁₈ H ₃₈	254
8	31,92	NI	a)	-	-
9	33,74	Nonadecano	d)	C ₁₉ H ₄₀	268
10	34,27	hexadecanoato de metila	e)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
11	36,78	Kaureno	c)	C ₂₀ H ₃₂	272
12	37,47	Manool	c)	C ₂₀ H ₃₄ O	290
13	38,22	labd-7,13-dien-15-ol	c)	C ₂₀ H ₃₄ O	290
14	42,73	dioctil-ester-hexanedióico	e)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370
15	49,20	NI (terpeno)	a)	-	-

a) terpeno (subclasse não identificada); b) sequiterpeno; c) diterpeno; d) hidrocarboneto e e) éster metílico de ácido carboxílico de cadeia longa.

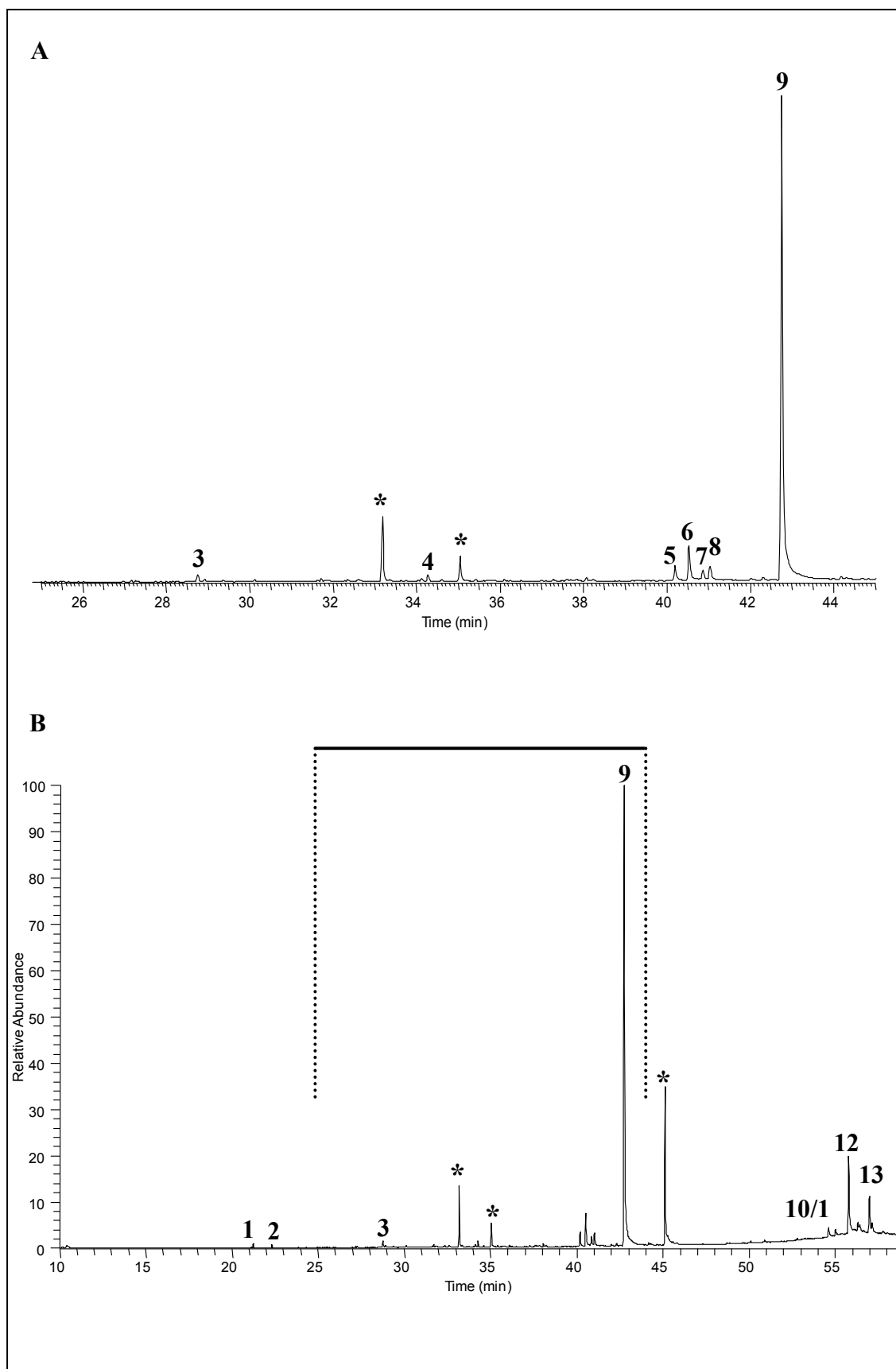


Figura 4: Perfil cromatográfico obtido após derivatização e análise da subfração P2B por CG/EM (B) e expansão na região de tempo de retenção 25-45 min (A). * interferente

Tabela 4: Compostos identificados no cromatograma da subfração P2B.

Pico	t_r (min)	nome	classe	FM	PM
1	21,24	α -muuroleno	b)	C ₁₅ H ₂₄	204
2	22,33	γ -muuroleno	b)	C ₁₅ H ₂₄	204
3	28,77	viridifloreno	b)	C ₁₅ H ₂₄	204
4	34,27	hexadecanoato de metila	e)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
5	40,20	NI	a)	-	-
6	40,52	NI	a)	-	-
7	40,87	1-octadeceno	d)	C ₁₈ H ₃₆	252
8	41,04	acetil labd-7,13-dien-15-ol	c)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358
9	42,73	dioctil-éster-hexanedióico	e)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370
10	54,62	NI	a)	-	-
11	55,03	NI	a)	-	-
12	55,79	estigmasterol	f)	C ₂₉ H ₄₈ O	412
13	56,98	sitosterol	f)	C ₂₉ H ₅₀ O	414

a) terpeno (subclasse não identificada); b) sequeiterpeno; c) diterpeno; d) hidrocarboneto;
e) éster metílico de ácido carboxílico de cadeia longa e f) fitoesterol.

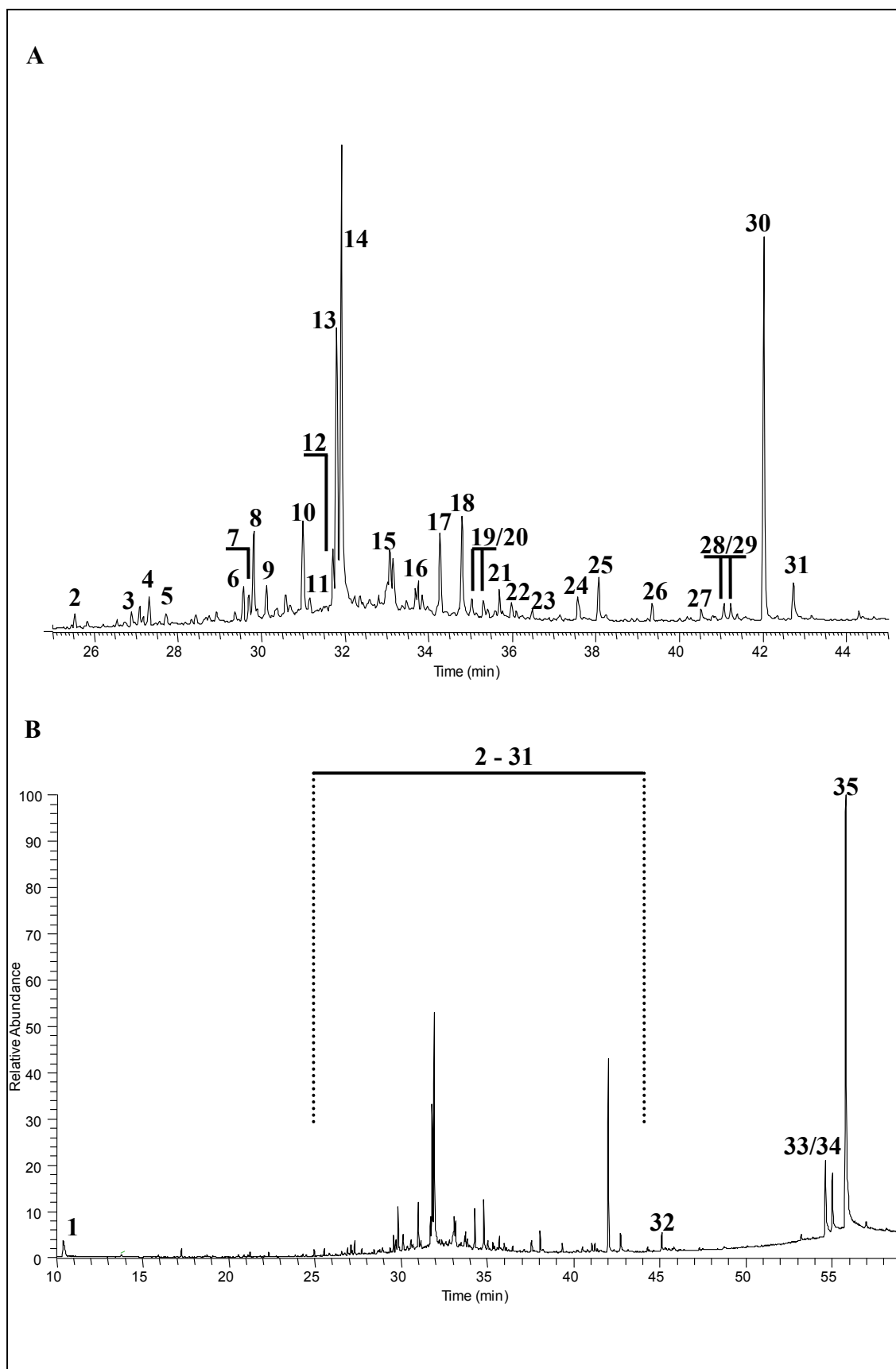


Figura 5: Perfil cromatográfico obtido após derivatização e análise da subfração n-hexano/acetato de etila (8:2) por CG/EM (B) e expansão na região de tempo de retenção 25-45 min (A).

Tabela 5: Compostos identificados no cromatograma da subfração n-hexano/acetato de etila (8:2).

Pico	t _r (min)	nome	classe	FM	PM
1	10,45	hidroxi-benzeno	g)	C ₆ H ₆ O	94
2	25,54	dodecanoato de metila	e)	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214
3	26,90	3-metóxi-4-acetil-benzaldeído	g)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194
4	27,31	hexadecano	d)	C ₁₆ H ₃₄	226
5	27,72	NI	a)	-	-
6	29,57	heptadecano	d)	C ₁₇ H ₃₆	240
7	29,71	NI	d)	-	-
8	29,81	NI	a)	-	-
9	30,12	tetradecanoato de metila	e)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
10	30,99	NI	a)	-	-
11	31,13	NI	e)	-	-
12	31,71	octadecano	d)	C ₁₈ H ₃₈	254
13	31,80	NI	a)	-	-
14	31,92	NI	a)	-	-
15	33,07	NI	g)	-	-
16	33,76	nonadecano	d)	C ₁₉ H ₄₀	268
17	34,27	hexadecanoato de metila	e)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
18	34,79	NI	e)	-	-
19	35,03	NI	g)	-	-
20	35,30	NI	a)	-	-
21	35,70	eicosano	d)	C ₂₀ H ₄₂	282
22	35,98	NI	e)	-	-
23	36,47	NI	g)	-	-
24	37,60	cis-9-Z-octadecenoato de metila	e)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
25	38,07	octadecanoato de metila	e)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298
26	39,35	docosano	d)	C ₂₂ H ₄₆	310
27	40,52	NI	a)	-	-
28	41,07	NI	d)	-	-
29	41,24	NI	a)	-	-
30	42,02	abietato de metila	c)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316
31	42,73	diocil-ester-hexanedióico	e)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370
32	45,12	NI	g)	-	-
33	54,62	NI	a)	-	-
34	55,03	estigmasterol	f)	C ₂₉ H ₄₈ O	412
35	55,79	sitosterol	f)	C ₂₉ H ₅₀ O	414

a) terpeno (subclasse não identificada); b) sequiterpeno; c) diterpeno; d) hidrocarboneto;

e) éster metílico de ácido carboxílico de cadeia longa; f) fitoesterol e g) composto fenólico.

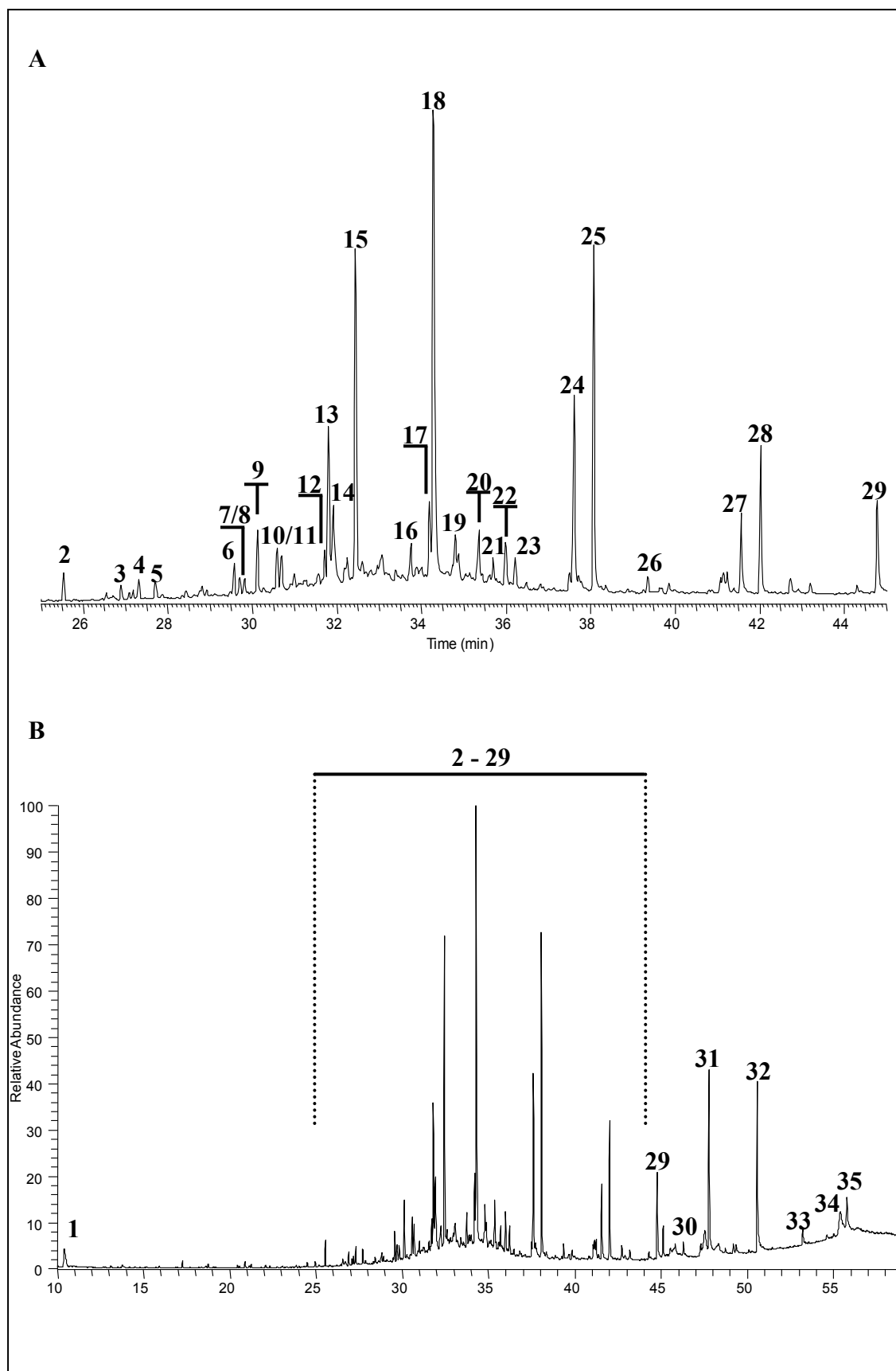


Figura 6: Perfil cromatográfico obtido após derivatização e análise da subfração n-hexano/acetato de etila (7:3) por CG/EM (B) e expansão na região de retenção 25-45 min (A).

Tabela 5: Compostos identificados no cromatograma da subfração n-hexano/acetato de etila (7:3).

Pico	t _r (min)	nome	classe	FM	PM
1	10,45	hidroxi-benzeno	g)	C ₆ H ₆ O	94
2	25,54	dodecanoato de metila	e)	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214
3	26,90	3-metóxi-4-acetil-benzaldeído	g)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194
4	27,31	hexadecano	d)	C ₁₆ H ₃₄	226
5	27,70	NI	a)	-	-
6	29,57	heptadecano	d)	C ₁₇ H ₃₆	240
7	29,71	NI	d)	-	-
8	29,81	NI	a)	-	-
9	30,12	tetradecanoato de metila	e)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
10	30,59	oplopanona	b)	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238
11	30,69	NI	a)	-	-
12	31,71	octadecano	d)	C ₁₈ H ₃₈	254
13	31,80	NI	a)	-	-
14	31,92	NI	a)	-	-
15	32,43	NI	g)	-	-
16	33,76	nonadecano	d)	C ₁₉ H ₄₀	268
17	34,19	NI	a)	-	-
18	34,27	hexadecanoato de metila	e)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
19	34,79	NI	e)	-	-
20	35,36	NI	a)	-	-
21	35,70	eicosano	d)	C ₂₀ H ₄₂	282
22	35,98	NI	e)	-	-
23	36,22	heptadecanoato de metila	e)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
24	37,60	cis-9-Z-octadecenoato de metila	e)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
25	38,07	octadecanoato de metila	e)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298
26	39,35	docosano	d)	C ₂₂ H ₄₆	310
27	41,55	eicosato de metila	e)	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326
28	42,02	abietato de metila	c)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316
29	44,78	docosato de metila	e)	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354
30	46,31	tricosato de metila	e)	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368
31	47,76	tetracosato de metila	e)	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382
32	50,57	hexacosato de metila	e)	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	410
33	53,20	octacosato de metila	e)	C ₂₉ H ₅₈ O ₂	438
34	55,39	NI	a)	-	-
35	55,76	NI	a)	-	-

a) terpeno (subclasse não identificada); b) sequiterpeno; c) diterpeno; d) hidrocarboneto;

e) éster metílico de ácido carboxílico de cadeia longa; f) fitoesterol e g) composto fenólico.

CAPÍTULO 3

Avaliação do efeito *in vitro* das frações e subfrações do extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* sobre a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos

1 - Avaliação do efeito *in vitro* das frações e subfrações do extrato metanólico bruto de *Hymenaea stigonocarpa* (ME) sobre a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos

1.1 – Material e método

1.1.1 – Reagentes

Tyrode

As substâncias utilizadas para o preparo da solução de Tyrode bem como as respectivas quantidades foram:

- NaCl: 4 g
- KCl: 100 mg
- CaCl₂: 55 mg
- NaH₂PO₄: 24 mg
- NaHCO₃: 500 mg
- Glicose: 500 mg
- O volume foi completado para 500 mL e a solução aerada com mistura carbogênica (95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono) por 8 minutos.
- Ao final o pH foi ajustado entre 7,2 e 7,4.

DMSO a 2% em Tyrode,

Utilizado como veículo para diluição do EM e suas partições e frações.

Tyrode heparinizado

Preparado através da adição de 0,04U de heparina em 40 mL de Tyrode.

Compostos secretores

Para o desafio dos mastócitos, 1,9635 mg de ionóforo A23187 (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) foram diluídos em 1 mL de DMSO. Em seguida diluiu-se 100 µL dessa

solução em 4,9 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de ionóforo A23187 a 75 μM , que foi alíquotada e armazenada a -4°C até o momento do uso.

Adicionalmente, 150 μg de composto 48/80 (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) foram diluídos para 12 mL com solução salina. A solução resultante (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi alíquotada e armazenada a -4°C até o momento do uso.

Novas soluções foram preparadas a cada 45 dias.

1.1.2 – Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 180 e 220 g fornecidos pelo Biotério Central da UNESP/Botucatu. Uma semana antes do experimento os animais foram transferidos para o Laboratório de Manutenção de animais de Experimentação do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à água e alimentação até o momento da realização dos procedimentos experimentais. O ensaio biológico descrito foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, SP.

1.1.3 – Obtenção da suspensão de mastócitos

Para obtenção da suspensão de mastócitos, os animais foram mortos por secção dos grandes vasos e vértebras cervicais. Em seguida a pele foi removida da região abdominal até o processo xifoide e foram injetados 30 mL de Tyrode contendo heparina na cavidade peritoneal. Após massagem vigorosa por 2 minutos a cavidade peritoneal foi aberta, o líquido retirado e filtrado em gaze umedecida com Tyrode. O líquido peritoneal resultante centrifugado a 22°C e 268.8g por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o “botão” de células resuspendido e lavado com 12 mL de Tyrode por duas vezes.

1.1.4 – Protocolo experimental

A suspensão de mastócitos foi incubada em banho-maria a 37°C por 5 minutos e em seguida separada em alíquotas de 500 μL .

Para o tratamento “*in vitro*” os grupos experimentais (n=4) foram denominados:

- Espontânea: 500 µL da suspensão de mastócitos incubados por 20 minutos,
- EM: 500 µL da suspensão de mastócitos adicionada de 50 µL do EM ou de suas respectivas frações ou subfrações em concentrações de 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/mL incubados por 20 minutos;
- EMI: 500 µL da suspensão de mastócitos adicionada de 50 µL do EM ou suas respectivas frações ou subfrações nas concentrações acima descritas, incubados por 10 minutos, seguido da adição de 20 µL de ionóforo A23187 (3 µM) e incubação por 10 minutos;
- EMC: 500 µL da suspensão de mastócitos adicionada de 50 µL do EM ou suas respectivas frações ou subfrações, nas concentrações acima descritas, incubados por 10 minutos seguido da adição de 20 µL de composto 48/80 (0,5 µg/mL) e incubação por 10 minutos.
- Em todos os grupos, após o período de incubação a liberação de histamina foi interrompida com a adição de 1,0 mL de Tyrode gelado.

1.1.5 – Determinação da liberação de histamina

Após o tratamento *in vitro* as suspensões foram centrifugadas (268,8 g por 5 min a 4°C). O sobrenadante separado e o precipitado resuspendido em 1,5mL de Tyrode. Ao final foram adicionados 50 µL de ácido perclórico 70% em todos os tubos. A dosagem de histamina foi realizada utilizando-se o método fluorimétrico descrito por Shore et al, 1959, através de um sistema de fluxo contínuo modular automático (Siraganian, 1974).

Os resultados foram expressos em porcentagem de liberação de histamina, calculada comparando-se a concentração da mesma no precipitado (intracelular) e no sobrenadante (extracelular), conforme descrito abaixo:

$$\% \text{ liberação de histamina} = \left[\frac{\text{Histamina sobrenadante}}{\text{Histamina sobrenadante} + \text{histamina precipitado}} \times 100 \right] - \text{espontanea}$$

1.1.6 – Análise estatística

Os resultados foram expressos em porcentagem de histamina liberada (média \pm E.P.M.) e avaliados por análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Dunnett. O nível de significância adotado foi de 0,05% ($p < 0,05$).

1.2 – Resultados

As frações P1, P2 e P3 nas concentrações utilizadas foram avaliadas na ausência dos compostos secretores (para verificar a influencia das mesmas sobre a liberação espontânea de histamina) e na presença do ionóforo A23187. A figura 1 mostra o efeito da P1 sobre a liberação de histamina espontânea e induzida pelo ionóforo A23187. A figura 2 demonstra o efeito da P2 sobre a liberação espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 e composto 48/80 de histamina. A figura 3 mostra o efeito da P3 sobre a liberação de histamina espontânea e induzida pelo ionóforo A23187.

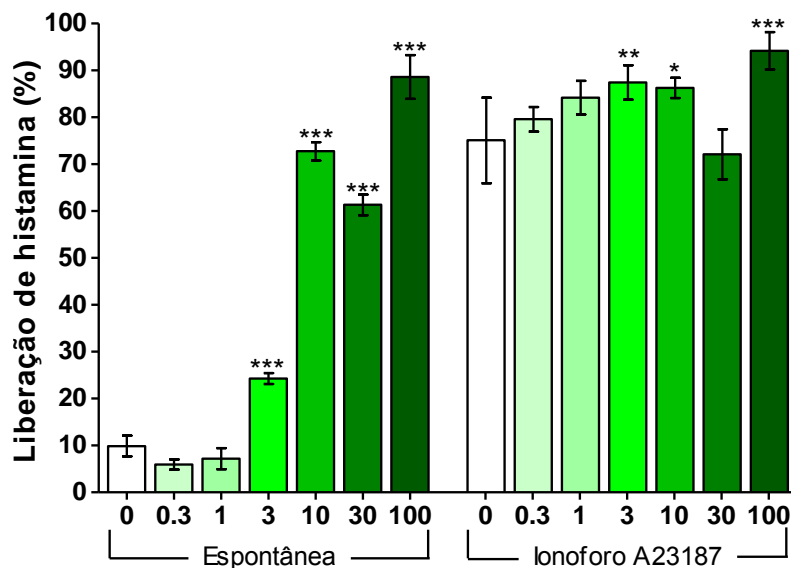


Figura 1: Efeito do tratamento *in vitro* com a fração P1 ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3\mu\text{M}$) em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

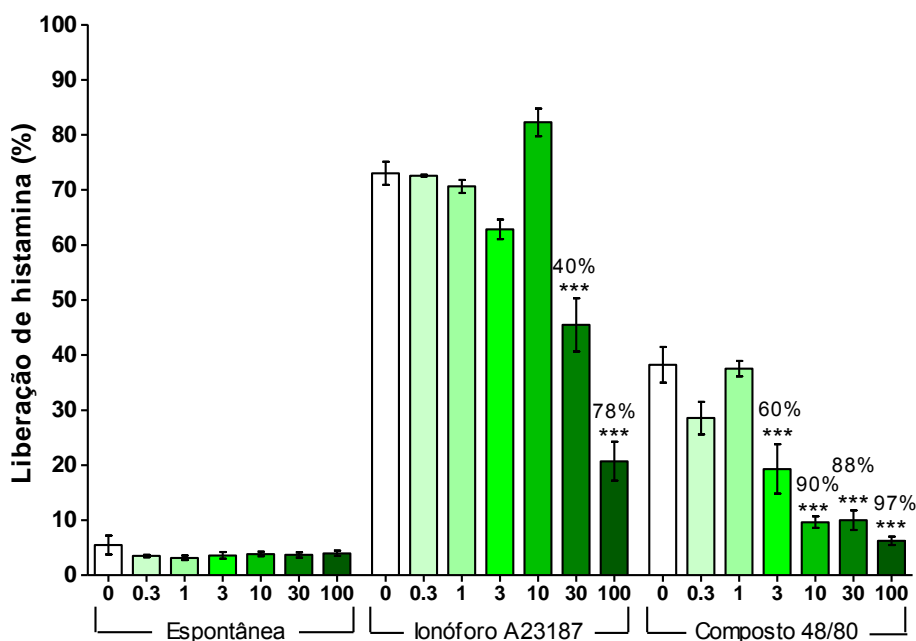


Figura 2: Efeito do tratamento *in vitro* com a fração P2 ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) e pelo composto 48/80 ($0,5 \mu\text{g/mL}$). *** $p < 0.001$ comparado ao grupo controle.

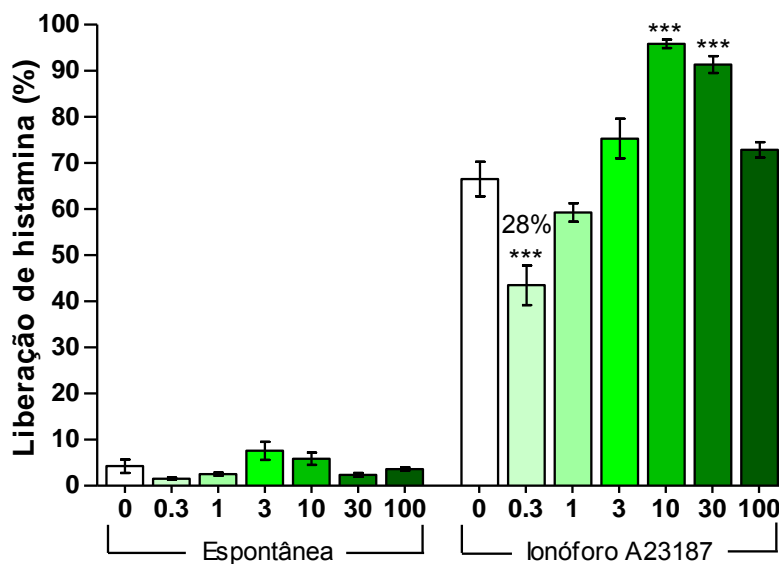


Figura 3: Efeito do tratamento *in vitro* com a fração P3 ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

Por ser a fração mais ativa, a P2 foi submetida a cromatografia líquida sob vácuo. As subfrações da P2 foram avaliadas quanto a seus efeitos sobre a liberação espontânea de histamina bem como sobre a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187. As figuras 4 a 9 mostram o efeito do tratamento *in vitro* com as subfrações da P2 sobre a liberação de histamina espontânea e induzida pelo ionóforo A23187. A subfração P2C foi mais ativa em inibir a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187 e dessa forma, foi avaliada quanto a liberação induzida pelo composto 48/80 (Figura 6).

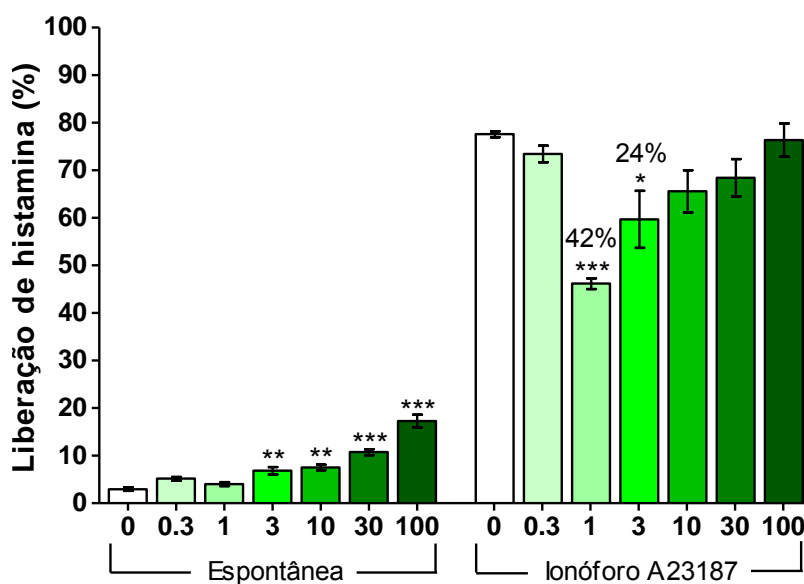


Figura 4: Efeito do tratamento *in vitro* com a sub fração P2A ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea de histamina e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

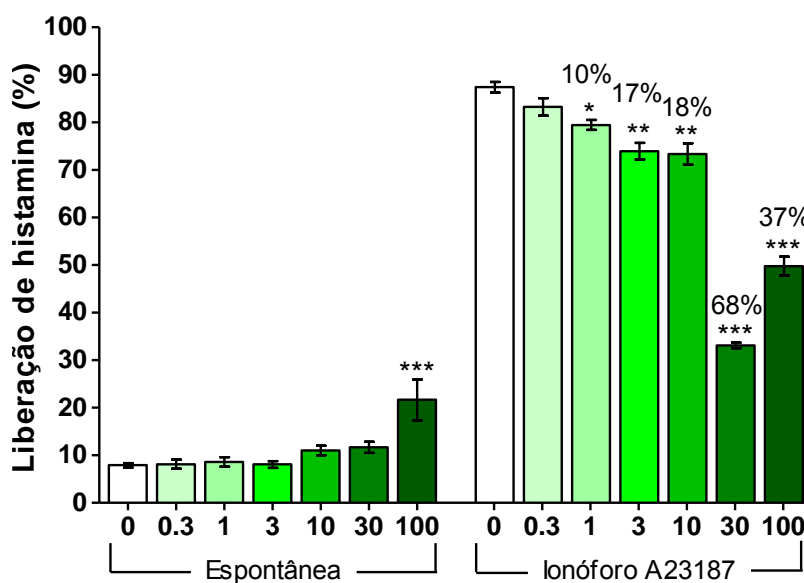


Figura 5: Efeito do tratamento *in vitro* com a subfração P2B ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

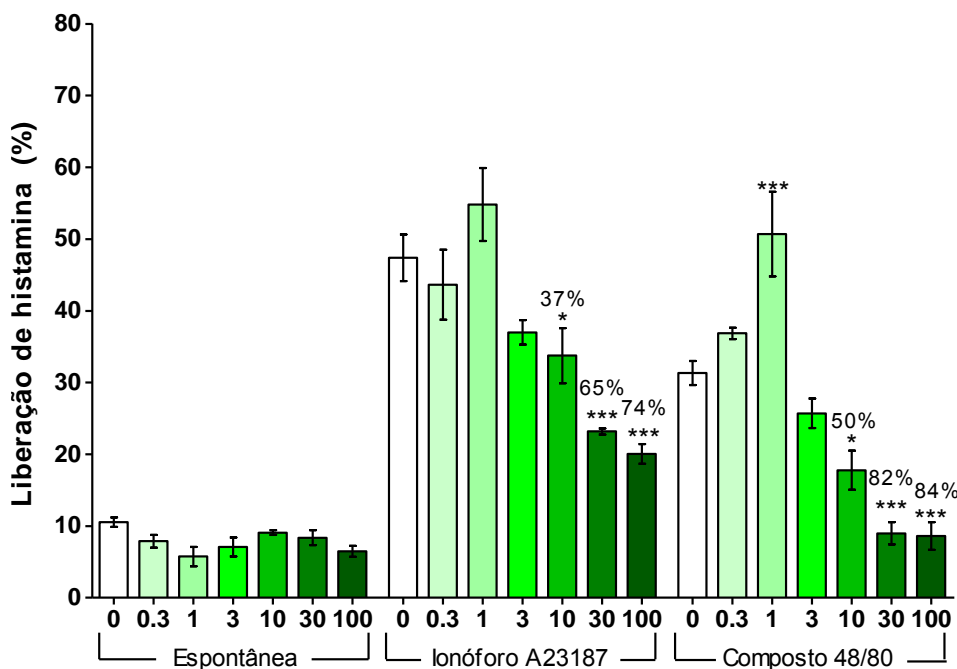


Figura 6: Efeito do tratamento *in vitro* com a subfração P2C ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) e composto 48/80 ($0,5 \mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

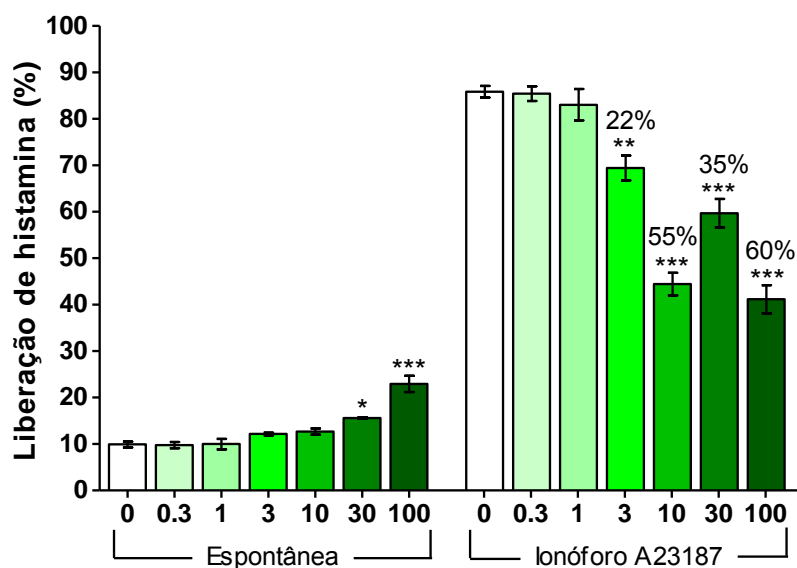


Figura 7: Efeito do tratamento *in vitro* com a subfração P2D ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

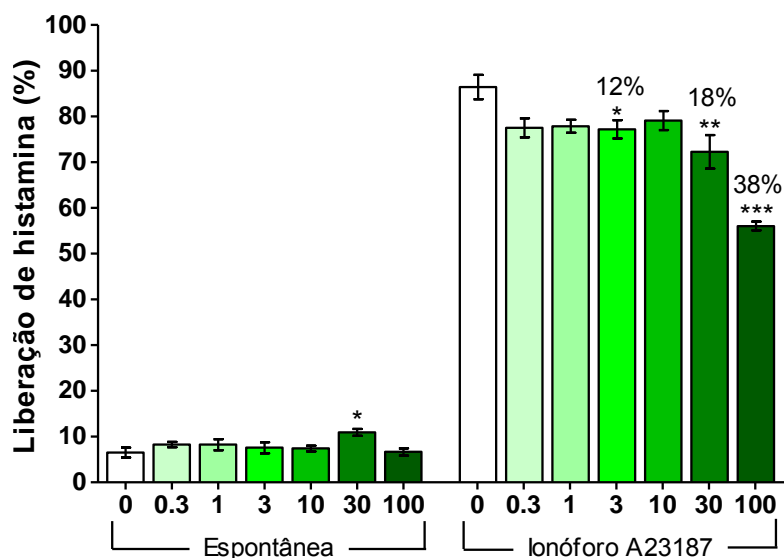


Figura 8: Efeito do tratamento *in vitro* com a subfração P2E ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

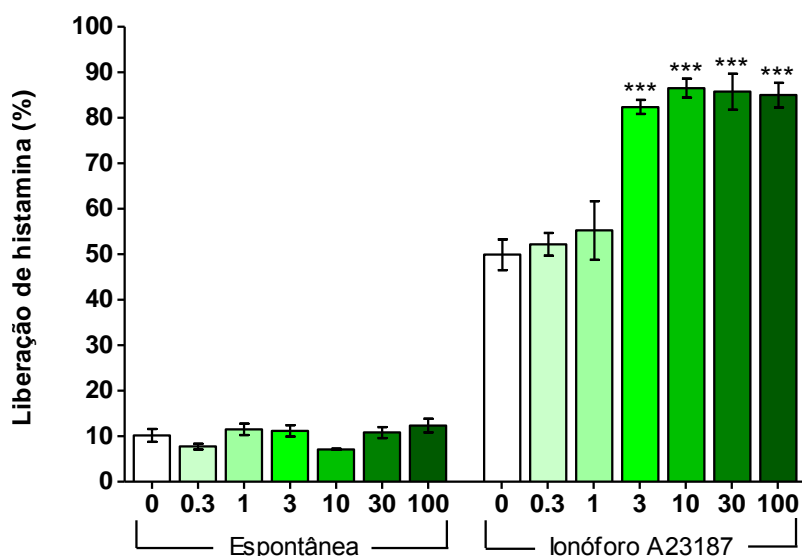


Figura 9: Efeito do tratamento *in vitro* com a subfração P2F ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) espontânea e induzida pelo ionóforo A23187 ($3 \mu\text{M}$) em mastócitos peritoneais de ratos Wistar. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

2 – Padronização do protocolo para sensibilização dos animais com ovoalbumina (OVA)

O efeito *in vitro* da P2 sobre a liberação de histamina foi avaliado em animais sensibilizados com OVA. Para a sensibilização foram utilizadas OVA e $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$. Os animais foram sensibilizados por via intraperitoneal com a injeção de 1 mL de solução contendo OVA (antígeno) e $\text{Al}(\text{OH})_3$ (adjuvante). Durante a padronização foram avaliados alguns protocolos nos quais foram utilizadas doses diferentes de OVA para sensibilização e desafio dos mastócitos bem como períodos diferentes após a sensibilização, conforme descritos na tabela 1.

Tabela 1: Protocolos avaliados para sensibilização dos animais com OVA

Protocolo	Sensibilização através da administração intraperitoneal de 1mL de	Avaliação do efeito <i>in vitro</i> após	Dose de OVA para desafio dos mastócitos
Controle	Salina	07 dias	1, 5, 10 e 50 µg
1	10 µg OVA + 10 mg de Al(OH) ₃	07 dias	1, 5, 10 e 50 µg
2	20 µg OVA + 20 mg de Al(OH) ₃	07 dias	1, 5, 10 e 50 µg
Controle	Salina	14 dias	1, 5, 10 e 50 µg
3	10 µg OVA + 10 mg de Al(OH) ₃	14 dias	1, 5, 10 e 50 µg
4	20 µg OVA + 20 mg de Al(OH) ₃	14 dias	1, 5, 10 e 50 µg

2.1 – Reagentes

Tyrode, Tyrode heparinizado e DMSO a 2%

Preparados conforme descrito no item 1.1.1

Ovoalbumina (OVA) utilizada para sensibilização dos animais

A solução de OVA e Al(OH)₃ (ambos Sigma Chemical Co. St Louis, EUA) utilizada para sensibilização dos animais foi preparada da seguinte forma:

- Em um bequer adicionar 1 mL de solução aquosa de OVA a 100 µg/mL e 1 mL de solução aquosa de AlK(SO₄)₂ a 100 mg/mL.
- Para os protocolos 2 e 4 (Tabela III) devem ser utilizadas soluções de OVA a 200 µg/mL e AlK(SO₄)₂ a 200 mg/mL;
- Ajustar o pH com NaOH 1N até 7,0;
- Centrifugar a 2000g por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;
- Ressuspender com solução salina até 10 mL;
- Centrifugar novamente a 2000g por 10 minutos e completar o volume para 10 mL;
- Ao final tem-se uma solução de OVA (10 µg/mL) + Al(OH)₃ (10 mg/mL).
- Para os protocolos 2 e 4 tem-se uma solução de OVA (20 µg/mL) + Al(OH)₃ (20 µg/mL).

- 1 mL da solução de OVA + Al(OH)₃ foi utilizado por via intraperitoneal para sensibilização dos animais em todos os protocolos.

Ovoalbumina utilizada para desafio dos mastócitos

Para o desafio dos mastócitos as soluções aquosas de OVA foram preparadas conforme descrito na tabela 2. Aliquotas de 100 µL foram armazenadas a 4°C e no momento do uso foram descongeladas e diluídas para 1 mL com água destilada.

Tabela 2: Preparo das soluções de OVA para desafio dos mastócitos

Solução estoque	Concentração final após diluição	Volume utilizado para o desafio dos mastócitos	Concentração de OVA na suspensão de mastócitos (µg/mL)
0,25 mg/mL	25 µg/mL	20 µL	1 µg
1,25 mg/mL	125 µg/mL	20 µL	5 µg
2,5 mg/mL	250 µg/mL	20 µL	10 µg
12,5 mg/mL	1250 µg/mL	20 µL	50 µg
25 mg/mL	2500 µg/mL	20 µL	100 µg

2.2 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 300 e 400 g fornecidos pelo Biotério Central da UNESP/Botucatu. Uma semana antes da sensibilização os animais foram transferidos para o Laboratório de Manutenção de animais de Experimentação do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à água e alimentação até o momento da realização dos procedimentos experimentais. O ensaio biológico descrito foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, SP.

2.3 – Obtenção da suspensão de mastócitos

A suspensão de mastócitos dos animais sensibilizados com OVA foi obtida após 7 e 14 dias da sensibilização e o procedimento utilizado está descrito no item 1.1.3

2.4 – Protocolo experimental

A suspensão de mastócitos foi incubada em banho-maria a 37°C por 5 minutos e em seguida separada em alíquotas de 500µL.

Para cada protocolo experimental (Tabela 1) os grupos experimentais (n=4) foram:

- Espontânea: 500 µL da suspensão de mastócitos incubados por 20 minutos;
- OVA 1 µg/mL: incubação de 500 µL da suspensão de mastócitos seguida da adição de 20 µL de OVA (25 µg/mL) e incubação por 20 minutos;
- OVA 5 µg/mL: incubação de 500 µL da suspensão de mastócitos seguida da adição de 20 µL de OVA (125 µg/mL) e incubação por 20 minutos;
- OVA 10 µg/mL: incubação de 500 µL da suspensão de mastócitos seguida da adição de 20 µL de OVA (250 µg/mL) e incubação por 20 minutos e
- OVA 50 µg/mL: incubação de 500 µL da suspensão de mastócitos seguida da adição de 20 µL de OVA (1250 µg/mL) e incubação por 20 minutos.
- OVA 100 µg/mL: incubação de 500 µL da suspensão de mastócitos seguida da adição de 20 µL de OVA (2500 µg/mL) e incubação por 20 minutos.
- Em ambos os grupos, após o período de incubação a liberação de histamina foi interrompida com a adição de 1,0 mL de Tyrode gelado.

2.5 – Determinação da liberação de histamina

A determinação da liberação de histamina foi realizada conforme descrito no item 1.1.5

2.6 – Resultados

Os protocolos avaliados para sensibilização dos animais estão descritos na tabela 1. A utilização do protocolo 1 não sensibilizou os animais (dados não demonstrados). Com os protocolos 2 e 4 (sensibilização com 20 μg de OVA e 20 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ a suspensão de mastócitos obtida não foi suficiente para a leitura no fluorímetro (dados não demonstrados). A figura 10 mostra o efeito de concentrações crescentes de OVA sobre a liberação de histamina após 14 dias da administração intraperitoneal de 1 mL de salina. A figura 11 mostra o efeito de concentrações crescentes de OVA em mastócitos após 14 dias de sensibilização dos animais utilizando-se o protocolo 3 (10 μg de OVA e 10 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$).

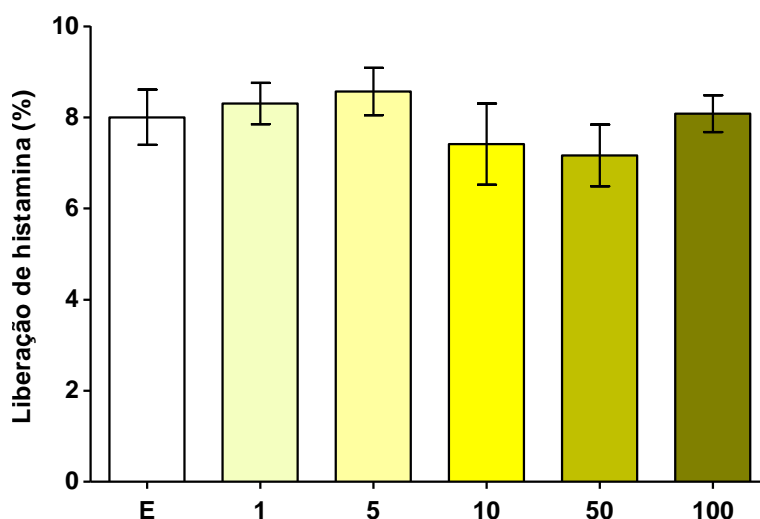


Figura 10: Efeito da OVA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) em mastócitos peritoneais após 14 dias de sensibilização dos animais com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OVA e 10 mg/mL de $\text{Al}(\text{OH})_3$. E – espontânea.

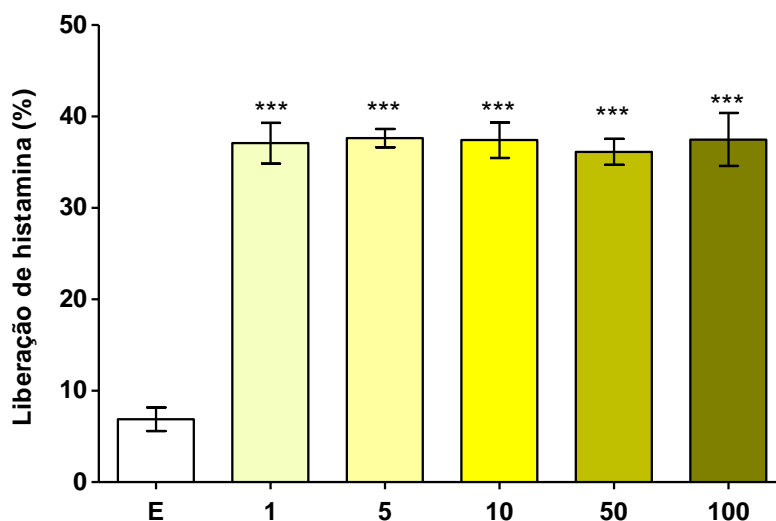


Figura 11: Efeito da OVA ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) em mastócitos peritoneais após 14 dias de sensibilização dos animais com 10 $\mu\text{g/mL}$ de OVA e 10 mg/mL de $\text{Al}(\text{OH})_3$. E – espontânea; *** $p < 0,001$ comparado a espontânea

3 – Avaliação do efeito *in vitro* da fração P2 sobre a liberação de histamina em mastócitos peritoneais de ratos Wistar sensibilizados com OVA

Baseado nos resultados da padronização (item 2), observou-se que a melhor dose de OVA para a sensibilização foi de 10 μg , adicionados de 10 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e a concentração mais adequada de OVA para desafio dos mastócitos foi de 250 $\mu\text{g/mL}$.

3.1 – Reagentes

Tyrode, Tyrode heparinizado e DMSO a 2%

Preparados conforme descrito no item 1.1.1

Ovoalbumina (OVA) utilizada para sensibilização dos animais

Solução de OVA (10 $\mu\text{g/mL}$) adicionada de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (10 mg/mL), preparada conforme item 2.

Ovoalbumina utilizada para desafio dos mastócitos

Solução de OVA a 2,5 mg/mL, preparada conforme descrito no item 2, tabela 2, armazenada em alíquotas de 100 µL a -4°C. No momento do uso o volume foi completado para 1 mL obtendo-se assim uma solução de OVA a 250 µg/mL.

3.2 - Animais

Os animais utilizados estão descritos no item 2.2, sensibilizados com a administração intraperitoneal de 1 mL de OVA (10 µg/mL) + Al(OH)₃ (10 mg/mL).

3.3 – Obtenção da suspensão de mastócitos

A suspensão de mastócitos dos animais sensibilizados foi obtida após 14 dias da sensibilização e o procedimento utilizado está descrito no item 1.1.3.

3.4 – Protocolo experimental

Os grupos experimentais (n=4) foram:

- C-OVA: 500 µL da suspensão de mastócitos adicionada de 50 µL de DMSO 0,2% (veículo) incubados por dez minutos seguido da adição de 20 µL de solução de OVA 250 µg/mL (10 µg) incubação por dez minutos;
- P2: 500 µL da suspensão de mastócitos adicionada de 50 µL da P2 em concentrações de 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/mL, incubados por dez minutos seguido da adição de 20 µL de solução de OVA 250 µg/mL (10 µg) e incubação por dez minutos.
- Cromoglicato: 500 µL da suspensão de mastócitos adicionada de 50 µL de cromoglicato de sódio (100 µg/mL), incubados por dez minutos seguido da adição de 20 µL de solução de OVA 250 µg/mL (10 µg) e incubação por dez minutos.
- Em todos os grupos, após o período de incubação a liberação de histamina foi interrompida com a adição de 1,0 mL de Tyrode gelado.

3.5 – Determinação da liberação de histamina

A determinação da liberação de histamina foi realizada conforme descrito no item 1.1.5.

3.6 – Resultados

A figura 12 mostra o efeito da fração P2 (0,3 a 100 $\mu\text{g/mL}$) e do cromoglicato de sódio (100 $\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina induzida pela OVA em animais sensibilizados.

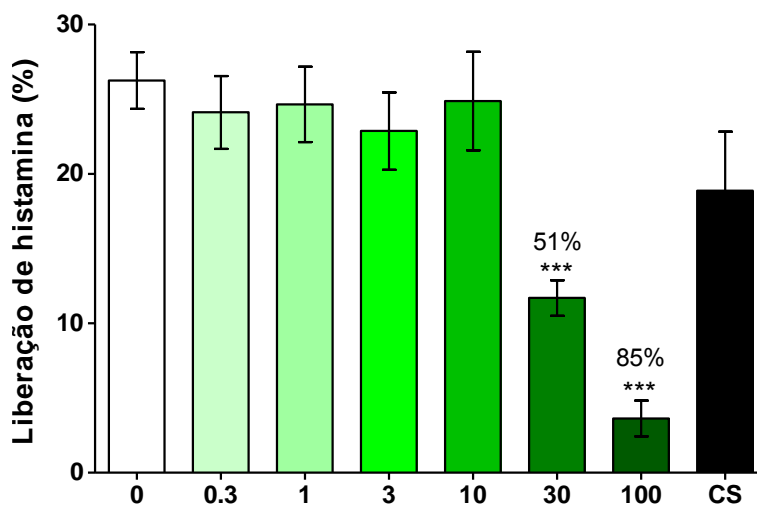


Figura 12: Efeito da P2 ($\mu\text{g/mL}$) sobre a liberação de histamina (média \pm E.P.M.) em mastócitos peritoneais sensibilizados com OVA. CS – Cromoglicato de sódio (100 $\mu\text{g/mL}$); *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

CAPÍTULO 4

Pesquisa de inibidores da secreção de histamina a partir do extrato metanólico bruto das cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa*

Search of inhibitors of histamine secretion from the crude methanol extract of the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa*

Adriano Cressoni Araujo^{1,2}, Leonardo Noboru Seito¹, Juliana Aparecida Severi¹, Luiz Claudio Di Stasi^{1*}

¹Univ. Estadual Paulista - UNESP, Institute of Biosciences, Department of Pharmacology, Laboratory of Phytomedicines, Botucatu, SP, Brazil.

²Univ. de Marília - UNIMAR – Department of Pharmacology, Marília, SP, Brazil.

**Corresponding author:* Luiz Claudio Di Stasi

Laboratory of Phytomedicines,

Department of Pharmacology, Institute of Biosciences,

Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, CEP

18618-000, Brazil.

Phone: +55 21 14 3880 0216

Fax: +55 21 14 3815 3744

e-mail: ldistasi@ibb.unesp.br

Abstract

Background: Allergic diseases have increased in recent years. In this context, the release of histamine by mast cells is a key event. Previous studies have shown that crude methanol extract from stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* (ME) was able to inhibit the histamine release induced by ionophore A23187 and compound 48/80. This work conducted a bioassay-guided fractionation of the ME through the inhibitory activity on histamine release.

Methods: The ME was fractionated by partition and the most active fraction was subjected to vacuum liquid chromatography. The fractions (0.3 to 100 µg/mL) were evaluated on the histamine release from rat peritoneum mast cells challenged by ionophore A23187, compound 48/80 or ovalbumin (only most active fraction) or not challenged (cytotoxicity studies). Quantification of histamine release was performed using an automatic fluorometric continuous flow system. Phytochemical studies were performed by GC/MS analysis.

Results: The partition of ME fractionated by ethyl acetate produced the most active fraction (P2) that inhibited respectively at 78, 97 and 85% histamine release induced by ionophore A23187, compound 48/80 and ovalbumin. Phytochemical analysis showed the presence of terpenes, and long chain fatty acids

1 - Introduction

The allergic diseases affect most of the population (Amin, 2012; Abrahan and Hofmann, 2010; Kim *et al.*, 2013; Sipos *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). A large number of individuals are sensitive to allergens, but not all presents symptoms, even when sensitized. However, it is estimated that 10% of the population of individuals sensitized, presents clinical manifestations such as rhinitis, food allergies or asthma (Busse, 2011). In this context, it is known that histamine release from mast cells is a key event (Huber, 2013; Pan, 2013; Sipos *et al.*, 2012). Despite the benefits, pharmacological therapy used in allergic reactions has limitations, especially with the systemic use or for long periods. Thus, the development of substances which inhibit the release of mediator is required (Sipos *et al.*, 2012). So, the interest in the called Complementary and Alternative Medicines (CAM) and especially compounds of plant origin has increased (Li, 2011).

In this context, our laboratory has an interest in the study of plants commonly used for the treatment of allergic reactions. To evaluate some Brazilian plants popularly used in the treatment of these diseases, we previously demonstrated that the crude methanol extract of the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* was able to significantly inhibit the release of histamine in peritoneal mast cells challenged with ionophore A23187 and compound 48/80 (Ferreira *et al.*, 2013).

Plants from the genus *Hymenaea* (Fabaceae) are widely distributed from Central America to South America (Domenech-Carbó *et al.*, 2009; Jayaprakasam *et al.*, 2007). Popularly called “Jatobá”, woody plants of this genus occur in all regions of Brazil (Ferreira and Sampaio, 1999). In Brazilian folk medicine, the species from *Hymenaea* are used against lung problems like bronchitis and asthma, stomach cramps and diarrhea, antioxidant, diuretic, expectorant, hepatoprotective (Lima *et al.*, 2007). The *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne known as “jatobá do cerrado”, “jataí” or “jutía” is a leguminous tree found in the Brazilian Savannah popularly used against inflammation (Grandi *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2011), gastric pain, ulcer and diarrhea (Grandi *et al.*, 1989), cough, and bronchitis. In addition, fruit flour has high fiber content, fruit pulp is used as a laxative and the resin as an aphrodisiac (Silva *et al.*, 2001).

Based on previous results, the aim of this study was to perform the bioassay-guided fractionation of the crude methanol extract of *Hymenaea stigonocarpa* in order to identify the fractions with the highest biological activity and their main phytochemical compounds.

2 - Material and Methods

2.1 – Drugs and chemicals

Chemicals were of analytical grade and were purchased from Sinth and Vetec, Brazil (methanol, ethyl acetate, n-hexane, NaCl, KCl, CaCl₂, NaH₂PO₄, NaHCO₃ and glucose), Sigma Chemical Co. St. Louis, USA (calcium ionophore A23187, compound 48/80 and ovalbumin) and Tedia Co. Fairfield, USA (solvents HPLC grade).

2.2 – Plant Material

Stem barks of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne were obtained from a native fragment of the Cerrado biome of Botucatu city São Paulo state, Brazil, in March 2009 by Dr. Leonardo Noboru Seito. A voucher specimen (number 5691) was identified by taxonomists and deposited in the Herbarium of São Paulo State University-UNESP/Bauru, Brazil.

2.3 – Preparation of the crude methanolic extract of stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* (ME)

The plant material was dehydrated on an air circulation chamber (45 °C, 48 hours) and powdered on a knife grinder. An amount of 690 g of the dried material was subjected to extraction by maceration at room temperature with absolute methanol (1000 ml, three times, 48 hours each). The methanolic solution was filtered on a Whatman paper filter and concentrated under reduced pressure (45°C) to yield the crude methanolic extract.

2.4 – Chemical analysis and fractionation of methanolic extract of stem bark of *Hymenaea stigonocarpa*

The bio-guided fractionation started by partition of 100.0 g of ME into 50% aqueous methanol (1500 ml) and n-hexane (450 mL, three times) followed by a partition with ethyl acetate (250 ml, five times). The organics and the remaining aqueous fractions were concentrated under reduced pressure until dryness (45° C), resulting on an n-hexane fraction (named P1), an ethyl acetate fraction (P2) and a hydroalcoholic fraction (P3). The most active fraction (P2) was re-fractionated by preparative Vacuum Liquid Chromatography technique on silicagel 60G (5 – 200 µm mesh size, Merck). The apparatus consisted of a sintered-glass Buchner filter funnel (5 cm internal diameter) packed with a silica gel (95.0 g) connect to a vacuum pump system (Sibata Scientific). An aliquot of 4.0 g of P2 was subjected to sequential elution with: n-hexane (1200 ml), n-hexane/ethyl acetate 9:1 (500 ml), n-hexane/ethyl acetate 8:2 (500 ml), n-hexane/ethyl acetate 7:3 (500 ml), n-hexane/ethyl acetate

1:1 (500 ml), ethyl acetate (1000 ml), ethyl acetate/methanol 1:1 (1000 ml), and methanol (1000 ml). The collected fractions were monitored by Thin Layer Chromatography (n-hexane/ethyl acetate mixtures, detection with anisaldehyde/H₂SO₄ reagent under UV-Vis light) and grouped into six fractions designated P2A to P2F. Next, the tentative identification of the active compounds was carried out by means of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry detector (Thermo Scientific® system) on a fused silica capillary column with stationary phase type polydimethylsiloxane and 5% phenyl (OV-5MS, Ohio Valley®), dimensions of 30 m length × 0.25 mm internal diameter × 0.25 mm thick film adsorbent. The Xcalibur software version 2.1.0, coupled with the NIST library 2.0, was used for acquisition and processing of data.

2.5 – Experimental protocol

2.5.1 – Animals

Male Wistar rats weighing 250-400 g from the Central Animal House of UNESP Botucatu were used in the experiments. The animals underwent an acclimatization period of one week in the Animal House of the Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, they had free access to food and water and were kept in standardized conditions (21 °C ± 2 °C, 60-70% humidity and light / dark cycle of 12 hours). All experiments were conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care, and all the experimental protocol was approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

2.5.2 – Obtaining cell suspensions

After rats euthanasia and rear section of large vessels and cervical vertebrae, 40 ml of Tyrode (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.4 mM NaHPO₄, 12 mM NaHCO₃ and 5.6 mM glucose) pH 7.4 added with heparin (5 units/ml) were injected into the peritoneal cavity of the animals. Then, the peritoneal fluid was filtered in gaze, centrifuged (150 x g for 5 min at 22 °C) and washed two times with Tyrode solution. After the third centrifugation, the wash was resuspended in Tyrode to perform *in vitro* treatments.

2.5.3 – *In vitro* treatments

The mast cell suspension was incubated in a water bath at 37 °C for 5 minutes and then separated into aliquots of 500 µl. For *in vitro* treatment experimental groups (n = 4) were as follows: a. Cell suspensions without treatments, which mast cell suspensions were incubated for 20 minutes; b. Cells suspensions treated with the fractions, which mast cells suspensions were incubated for 20 minutes containing 50 µl of the fractions at concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 and 100 µg/ml, c. ionophore A23187 group, which mast cell suspensions were incubated for 10 minutes with 50 µl of the fractions (concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 and 100 µg/ml), stimulated with 20 µl of ionophore A23187 at 3 µM and incubated for another 10 minutes; d. compound 48/80 group (only for P2 and P2C, most active fractions), which mast cell suspensions were incubated for 10 minutes with 50 µl of the fractions (concentrations of 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 and 100 µg/ml), stimulated with 20 µl of compound 48/80 at 0.5 µg/ml and incubated for another 10 minutes. In all groups, after incubation period, histamine release was stopped with 1.0 ml cold Tyrode's solution.

2.5.4 – *In vitro* treatment with fraction P2 in sensitized animals with ovalbumin (OVA)

The *in vitro* effect of the fraction P2 on the histamine release induced by antigen (OVA) was evaluated in peritoneal mast cells from male Wistar rats sensitized by intraperitoneal administration of 1 ml of solution containing OVA (10 µg) and Al(OH)₃ (10 mg). After 14 days of the sensitization the mast cell suspension was obtained as described in item 2.5.2. For treatment experimental mast cells suspensions (n=4) were incubated with 50 µl of fraction P2 (0.3; 1; 3; 10; 30 and 100 µg/mL) or sodium cromoglycate (100 µg/ml) for 10 min at 37 °C. Subsequently were added 20 µL of the OVA (10 µg/ml) and incubated for 10 min. In both groups, after the incubation period the histamine secretion was interrupted with 1.0 ml of cold Tyrode's solution.

2.5.5 – Determination of histamine release

After treatments, the suspensions were centrifuged (150 x g for 5 min at 4°C). Supernatants were transferred to another tube and the pellets resuspended in 1.5 ml of Tyrode solution. At the end 50 µl of 70% perchloric acid were added in all tubes. The dosage of histamine was performed using the fluorimetric method described by Shore et al., 1959 and

the percentage of histamine release was calculated by comparing the concentration of the precipitate (intracellular) and supernatant (extracellular).

2.6 – Statistical Analysis

The results were expressed as percentage of histamine released (mean ± S.E.M.) and evaluated by analysis of variance (ANOVA) supplemented with Dunnett's test. The level of significance was set at $P < 0,05$.

3 - Results

3.1 – Yield of the extractive methods

The figure 1 show the yield of fractions obtained from crude methanol extract of stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* (ME) and ethyl acetate fraction (Subfractions from P2).

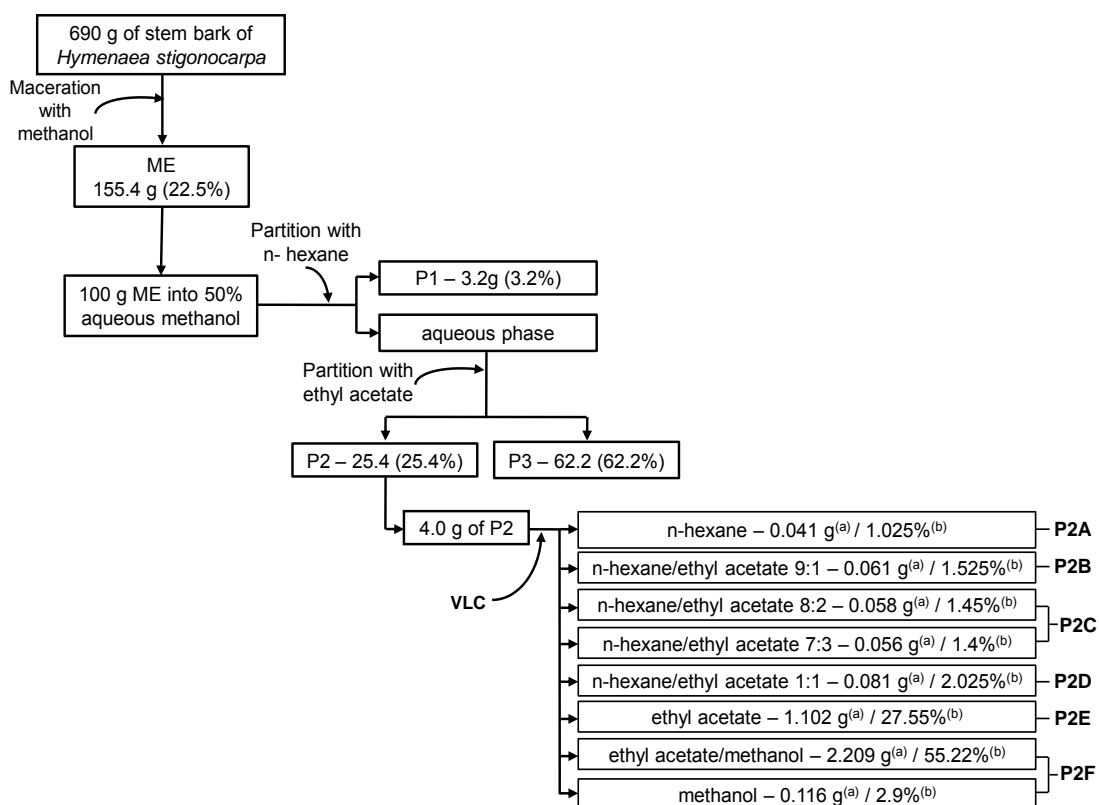


Figure 1: Representative flowchart of bioguided-fractionation of ME of *Hymenaea stigonocarpa*. ME: crude methanolic extract; P1: n-hexane fraction; P2: ethyl acetate fraction; P3: hidroalcoholic fraction; VLC: vacuum liquid chromatography; a: absolute yield; b: relative yield.

3.2 – Effect of *in vitro* treatment with vehicle and fractions from ME on the spontaneous and induced histamine release in suspensions of rat peritoneal mast cells

The vehicle (DMSO 0.2% in Tyrode) did not alter the spontaneous release of histamine and total content of histamine of mast cell suspension (data not shown).

Fraction P1 at concentrations from 3 $\mu\text{g/ml}$ increased the spontaneous histamine release (Fig. 2). At concentrations of 3, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$, fraction P2 increased the histamine release induced by ionophore A23187 (Fig. 2).

All concentrations of fraction P2 did not alter the spontaneous release of histamine. At concentrations of 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$ fraction P2 significantly inhibited the histamine release induced by ionophore A23187 at 40 and 77% respectively. Additionally, at concentrations of 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/mL}$ this fraction inhibit significantly the histamine release induced by compound 48/80 in 60, 90, 88 and 97% respectively (Fig 3).

Finally, fraction P3 did not alter the spontaneous histamine release and when used at concentration of the 3 $\mu\text{g/ml}$ and it was able to inhibit the histamine release induced by ionophore A23187 in 28% (Fig 4).

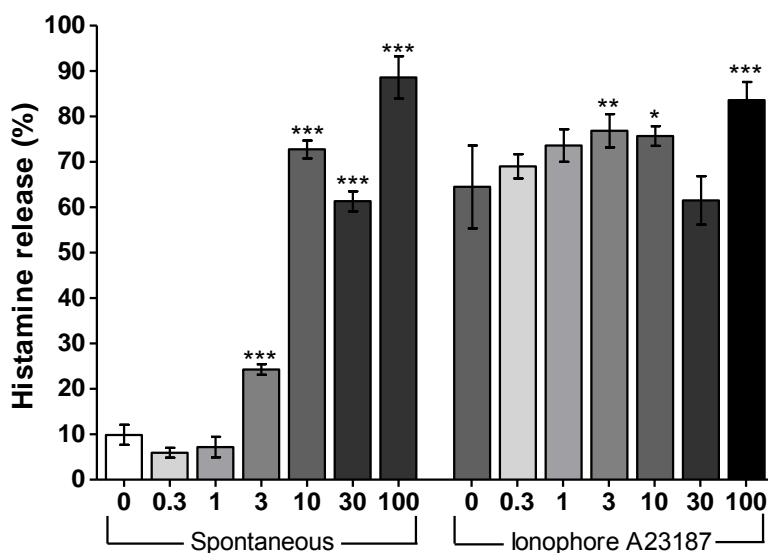


Figure 2: Effect of the fraction P1 ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 (3 μM) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

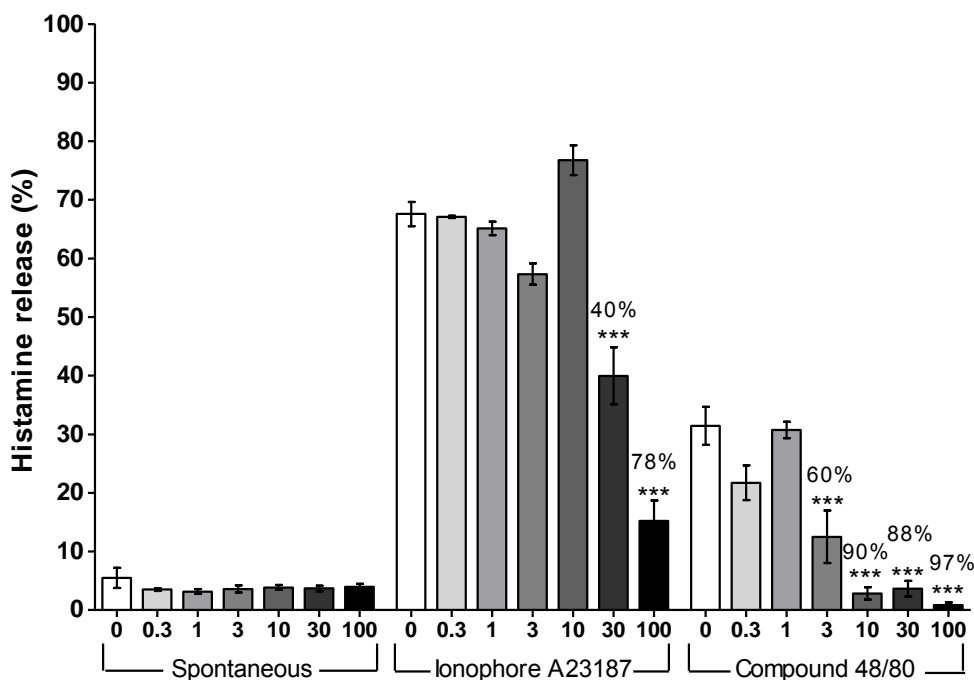


Figure 3: Effect of the fraction P2 ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) and compound 48/80 ($0.5 \mu\text{g/ml}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

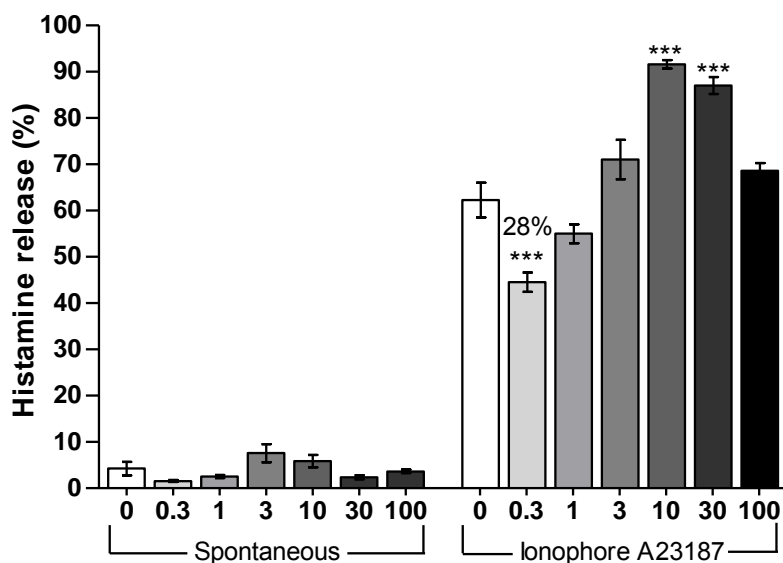


Figure 4: Effect of the fraction P3 ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

3.3 – Effect of *in vitro* treatment with sub-fractions from P2 on the spontaneous and induced histamine release in suspensions of rat peritoneal mast cells

Since fraction P2 produced better inhibitory activity on the induced histamine release, a fractionation by VLC (vacuum liquid chromatography) was performed and 6 sub-fractions (P2A to P2F) were obtained. Sub-fraction P2A increased spontaneous release of histamine at all concentrations from 3 to 100 $\mu\text{g/ml}$. When used at concentrations of 1 and 3 $\mu\text{g/ml}$, P2A significantly inhibited the histamine release induced by ionophore A23187 in 42 and 24% respectively (Fig 5).

As shown in figure 6, sub-fraction P2B at concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ significantly increased the spontaneous release of histamine. At concentrations respectively of 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$ this sub-fraction significantly inhibited the histamine release induced by ionophore A23187 in 10, 17, 18, 68 and 37% respectively.

Sub-fraction P2C did not alter the spontaneous release of histamine and at concentrations of 10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$ was able to significantly inhibit the histamine release induced by ionophore A23187 in 37, 65 and 74% respectively. This sub-fraction, in these same concentrations was able to significantly inhibit the histamine release induced by compound 48/80 at 50, 82 and 84% respectively (Fig 7).

Figure 8 shows that sub-fraction P2D at concentrations of 30 and 100 $\mu\text{g/mL}$ significantly increased the spontaneous release of histamine. At concentrations of the 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$, this sub-fraction significantly inhibited the histamine release induced by ionophore A23187 in 22, 55, 37 and 60% respectively.

Sub-fraction P2E at concentration of the 30 $\mu\text{g/mL}$ significantly increased the spontaneous release of histamine, however concentrations of 30 and 100 $\mu\text{g/mL}$, sub-fraction P2E were able to significantly inhibit histamine release induced by ionophore A23187 at 18 and 38% respectively (Fig 9).

Finally, sub-fraction P2F did not alter spontaneous histamine release and significantly increased the histamine release induced by ionophore A23187 at all concentrations from 3 to 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig 10).

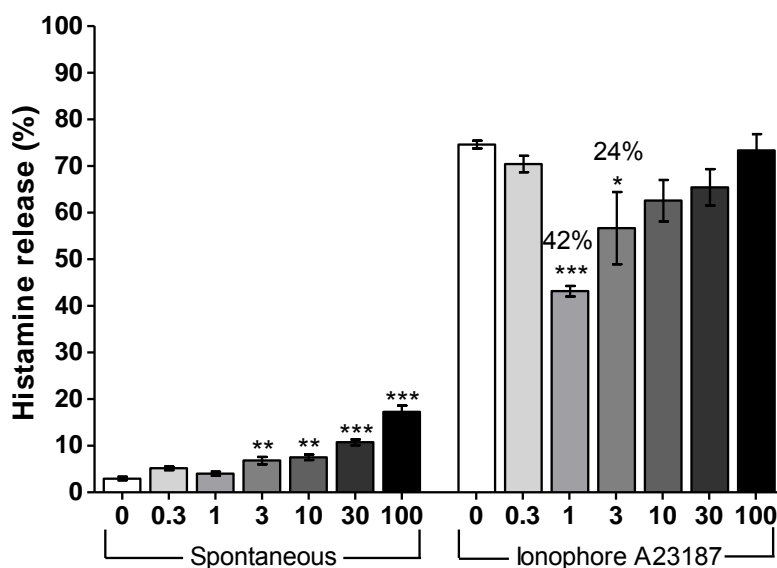


Figure 5: Effect of the sub-fraction P2A ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

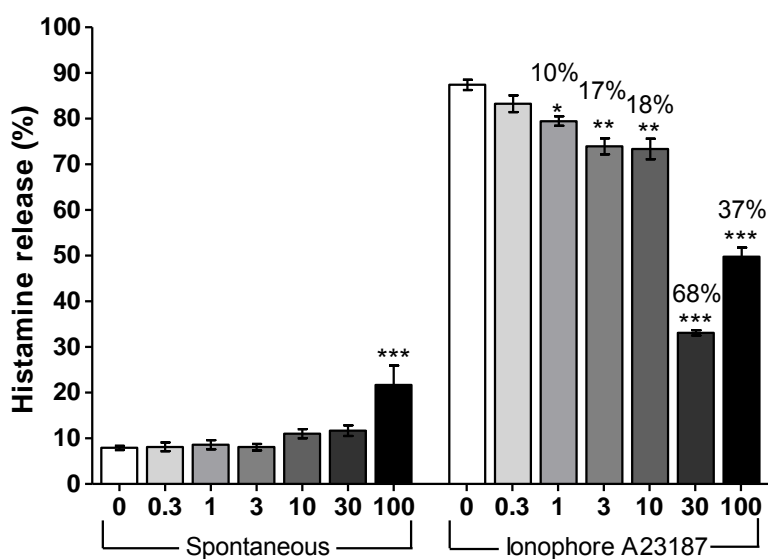


Figure 6: Effect of the sub-fraction P2B ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

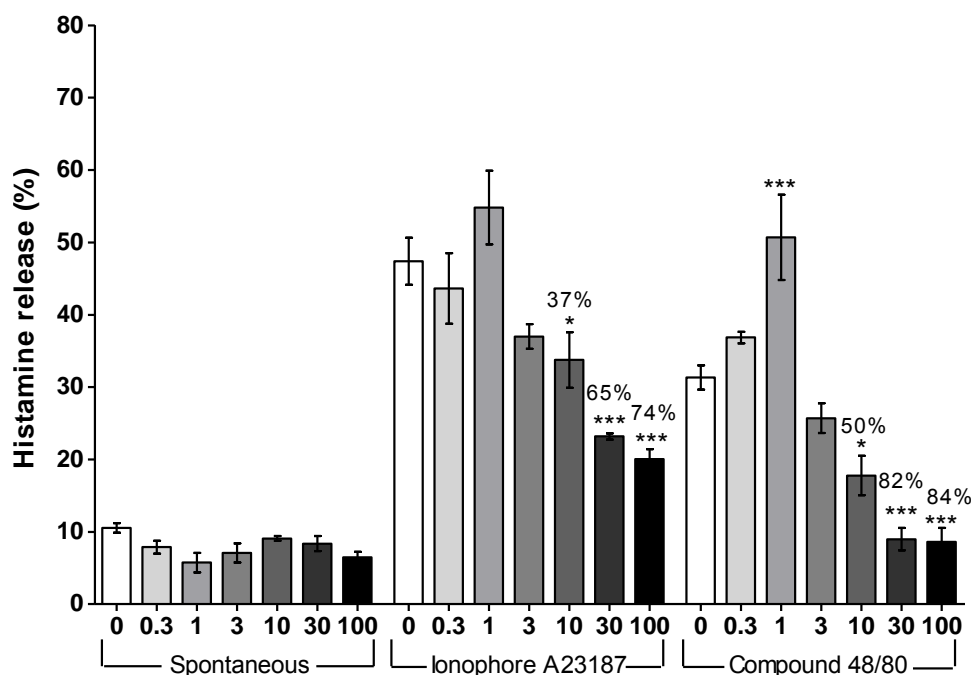


Figure 7: Effect of the sub-fraction P2C ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) and compound 48/80 ($0.5 \mu\text{g/ml}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

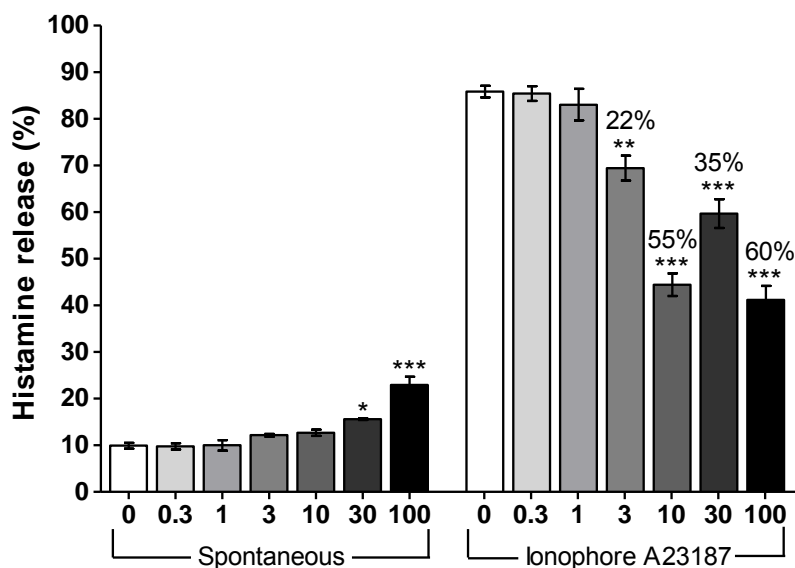


Figure 8: Effect of the sub-fraction P2D ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

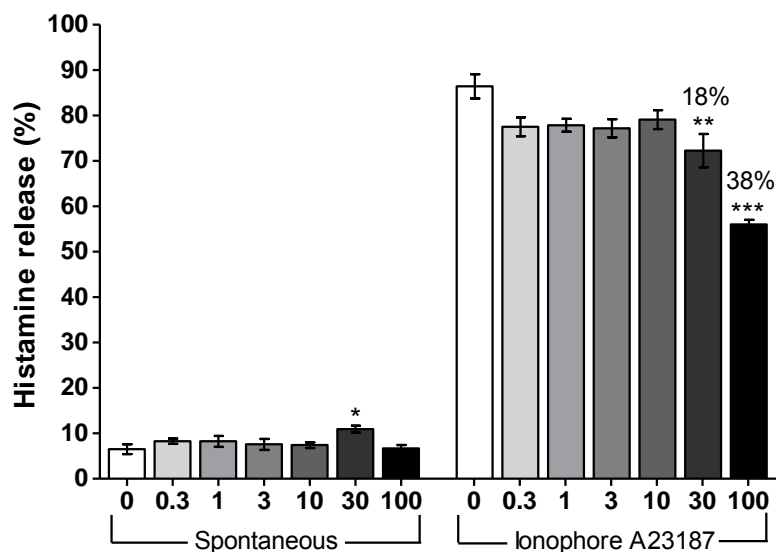


Figure 9: Effect of the sub-fraction P2E ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

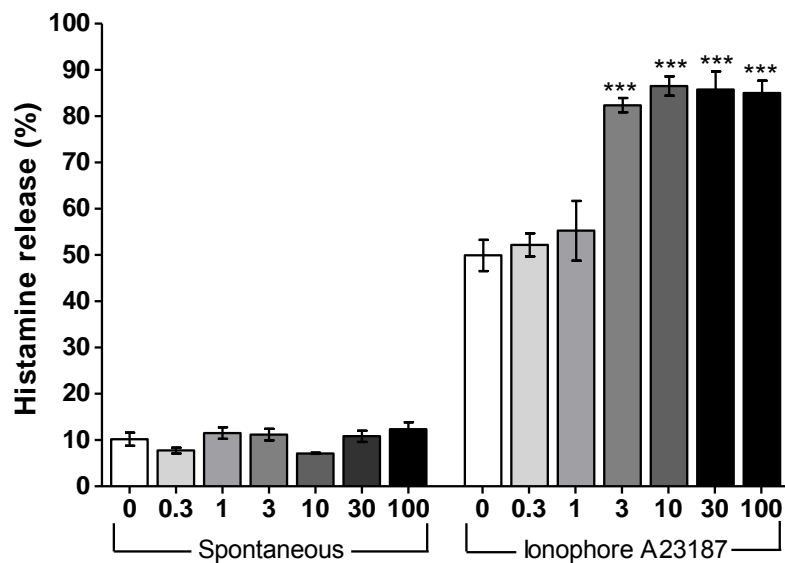


Figure 10: Effect of the sub-fraction P2F ($\mu\text{g/ml}$) on the histamine release (mean \pm S.E.M.), spontaneous and induced by ionophore A23187 ($3 \mu\text{M}$) in peritoneal mast cells from male Wistar rats ($n = 4$). *** $p < 0.001$ were compared to the control group.

3.4 – Effect of *in vitro* treatment with the fraction P2 on the histamine release induced by antigen (OVA) in suspensions of peritoneal mast cells of male Wistar rats sensitized

Fraction P2 at concentrations of 30 and 100 $\mu\text{g/mL}$ significantly inhibited the histamine release induced by antigen in sensitized mast cells, respectively in 51 and 85 %. The inhibitory effect at 100 $\mu\text{g/mL}$ was greater than the effect produced by sodium cromoglycate at the same concentration (Fig. 11).

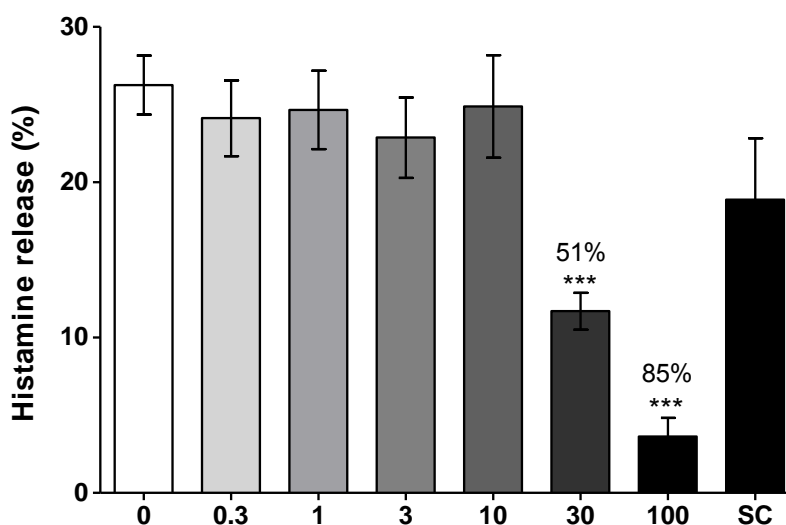


Figure 11: Effect of treatment with P2 ($\mu\text{g/ml}$) on histamine release (mean \pm S.E.M.) induced by OVA in peritoneal mast cells of male Wistar rats sensitized with OVA ($n=6$). The percentage indicates the inhibition of histamine release. SC – sodium cromoglycate; *** $p<0.001$ were compared to control group.

3.5 – Phytochemical analysis of the sub-fractions from P2 by GC / MS

The phytochemical analyses of the most actives sub-fractions showed the presence of terpenes and long chain fatty acids (as described methyl ester of long chain carboxylic acids) Figures 12 and 13 show the chromatographic profile of sub-fractions P2A and P2B. The sub-fraction P2C was evaluated separately in the form the sub-fraction n-hexane/ethyl acetate (8:2) and sub-fraction n-hexane/ethyl acetate (7:3), which has shown their chromatographic profiles in the Figures 14 and 15. The subfractions and P2D P2E present compounds with higher polarity and even after derivatization could not be analyzed by GC/MS.

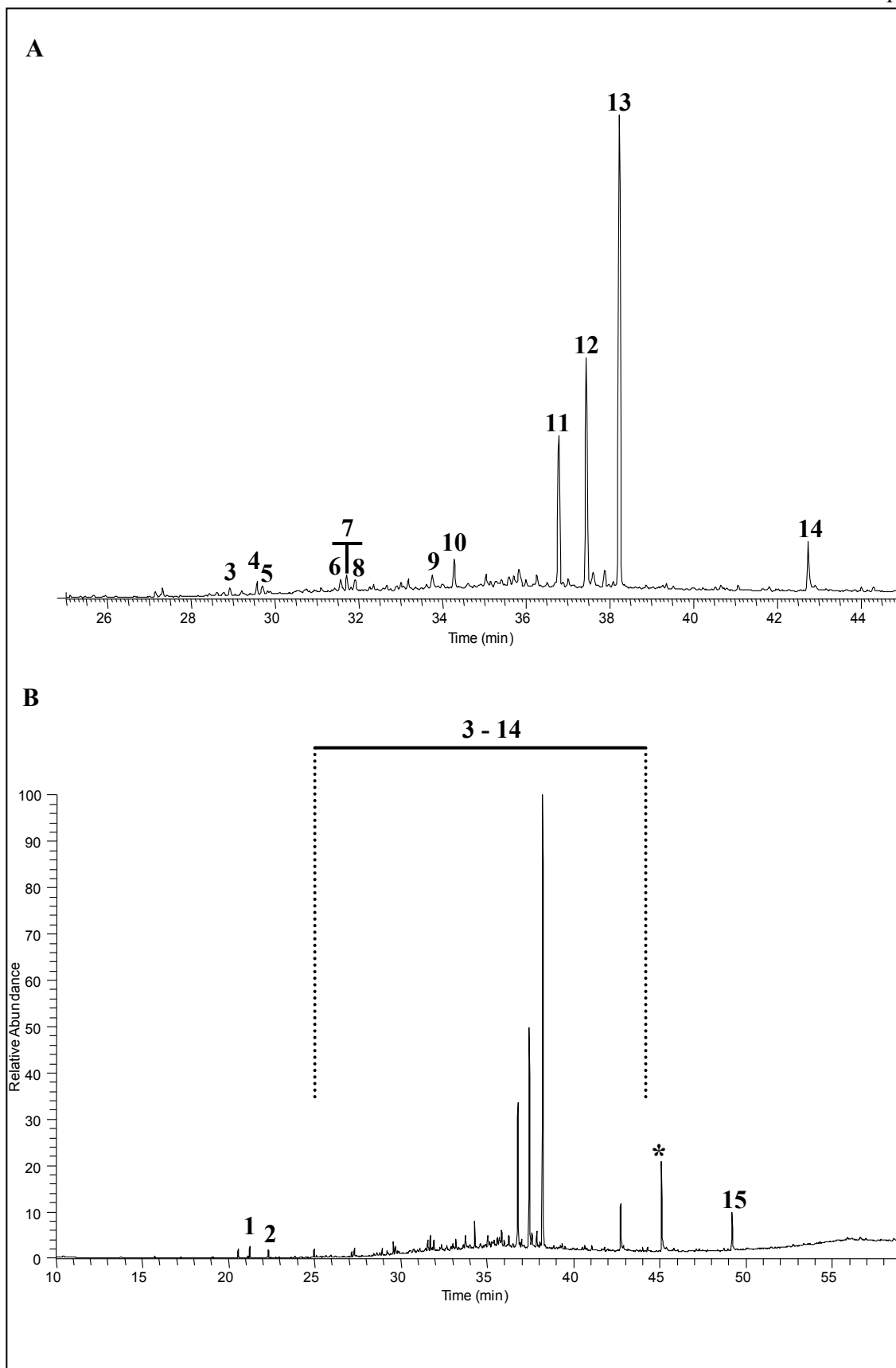


Figure 12: Chromatographic profile of the sufraction P2A obtained by GC/MS (B) and expansion on the retention time 25 to 45 minutes (A). Peaks: 15 – terpene (sub-group not identified); 1, 2 and 3 – sesquiterpenes; 11, 12 and 13 – diterpenes; 10 and 14 – methyl esters of long chain carboxylic acid; * interfering

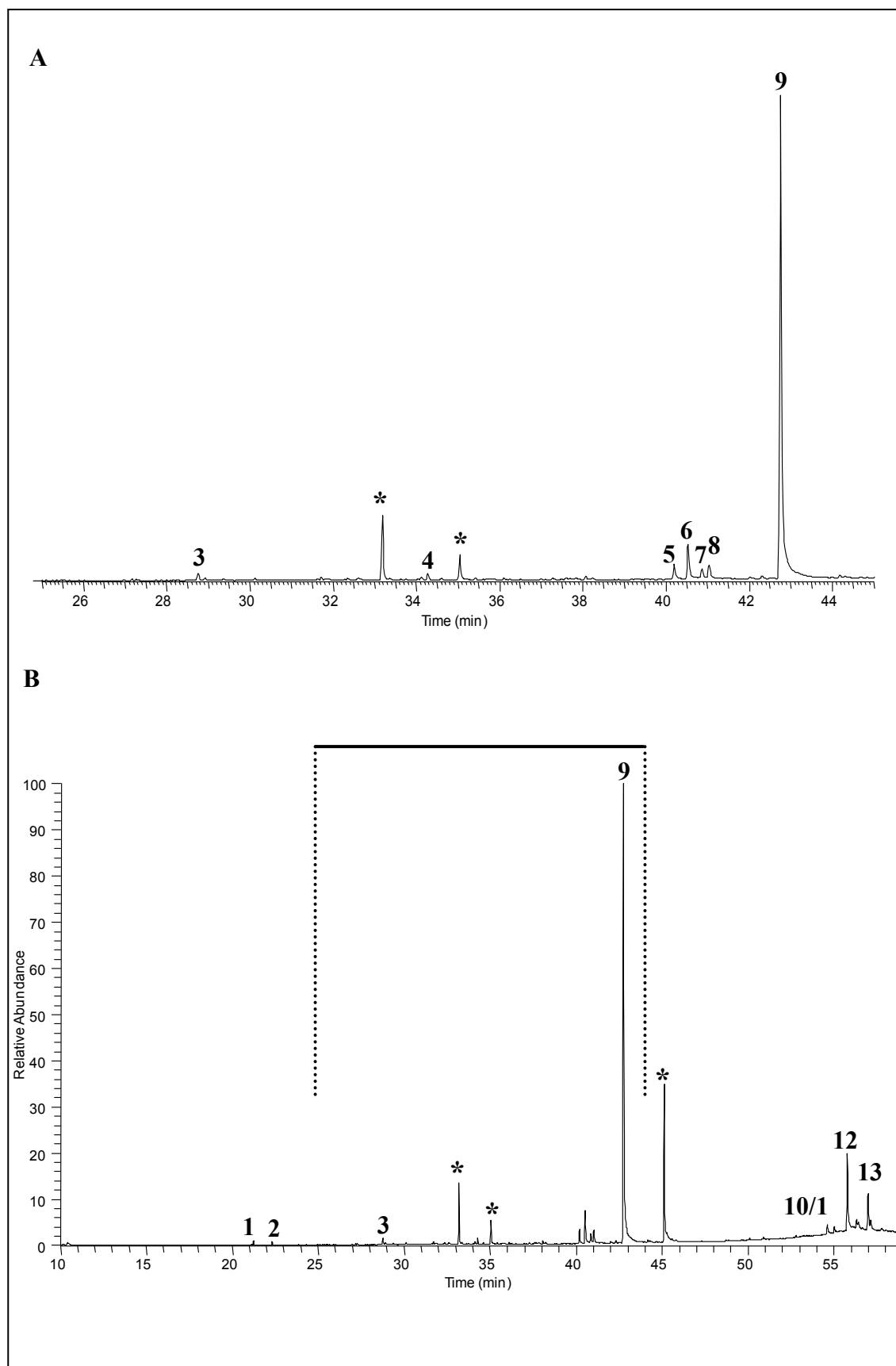


Figure 13: Chromatographic profile of the sufraction P2B obtained by GC/MS (B) and expansion on the retention time 25 to 45 minutes (A). Peaks: 5, 6, 10 and 11 – terpenes (sub-group not identified); 1, 2 and 3 – sesquiterpenes; 8 - diterpenes; 12 and 13 – sterols; 4 and 9 – methyl ester of long chain carboxylic acid; * interfering

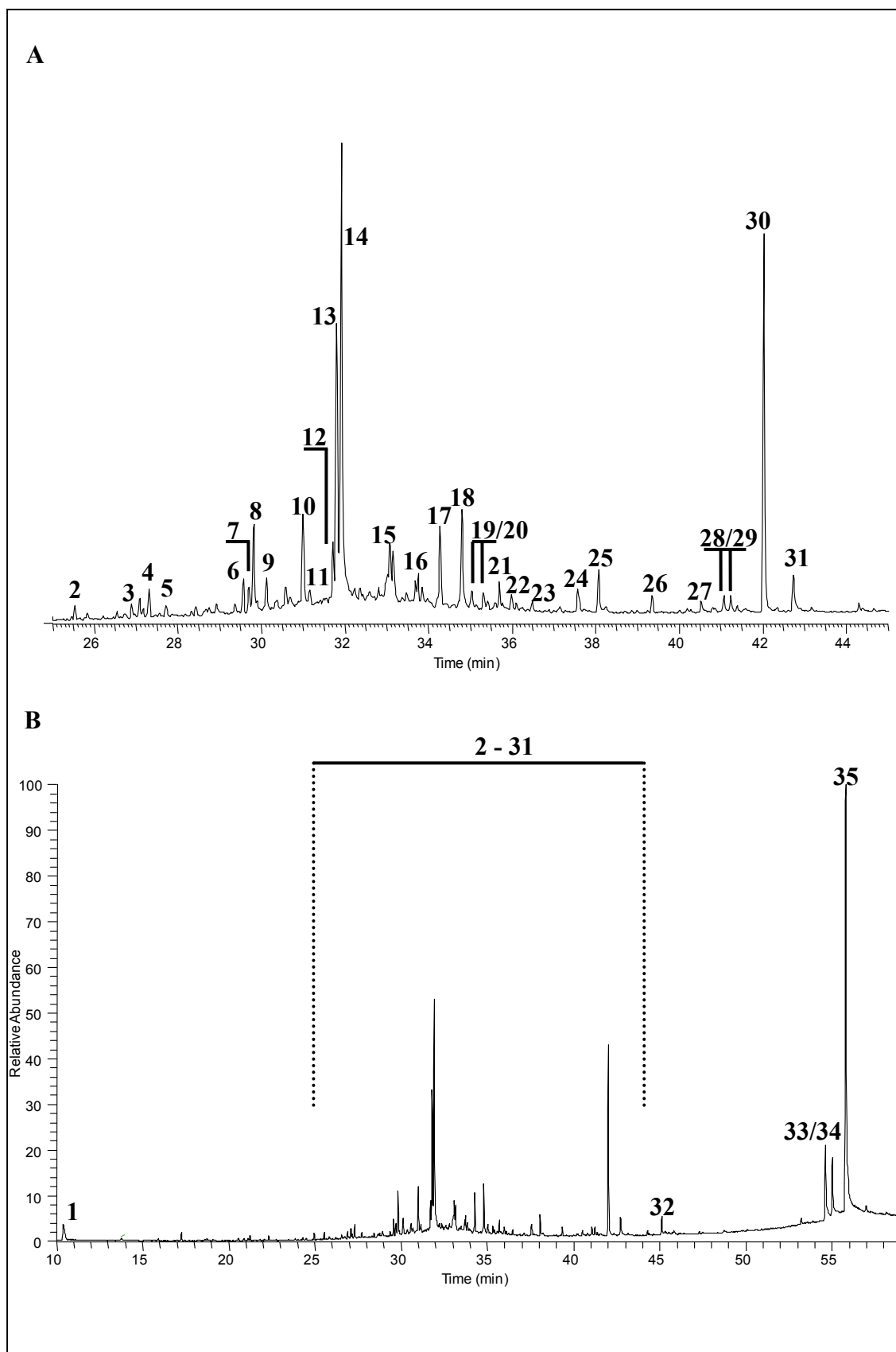


Figure 14: Chromatographic profile of the sufraction n-hexane/ethyl acetate (8:2) obtained by GC/MS (B) and expansion on the retention time 25 to 45 minutes (A). Peaks: 8, 10, 14, 20 and 27 – terpenes (sub-group not identified); 30 - diterpene; 34 and 35 – sterols; 2, 9, 11, 17, 18, 22, 24, 25 and 31 – methyl esters of long chain carboxylic acid;

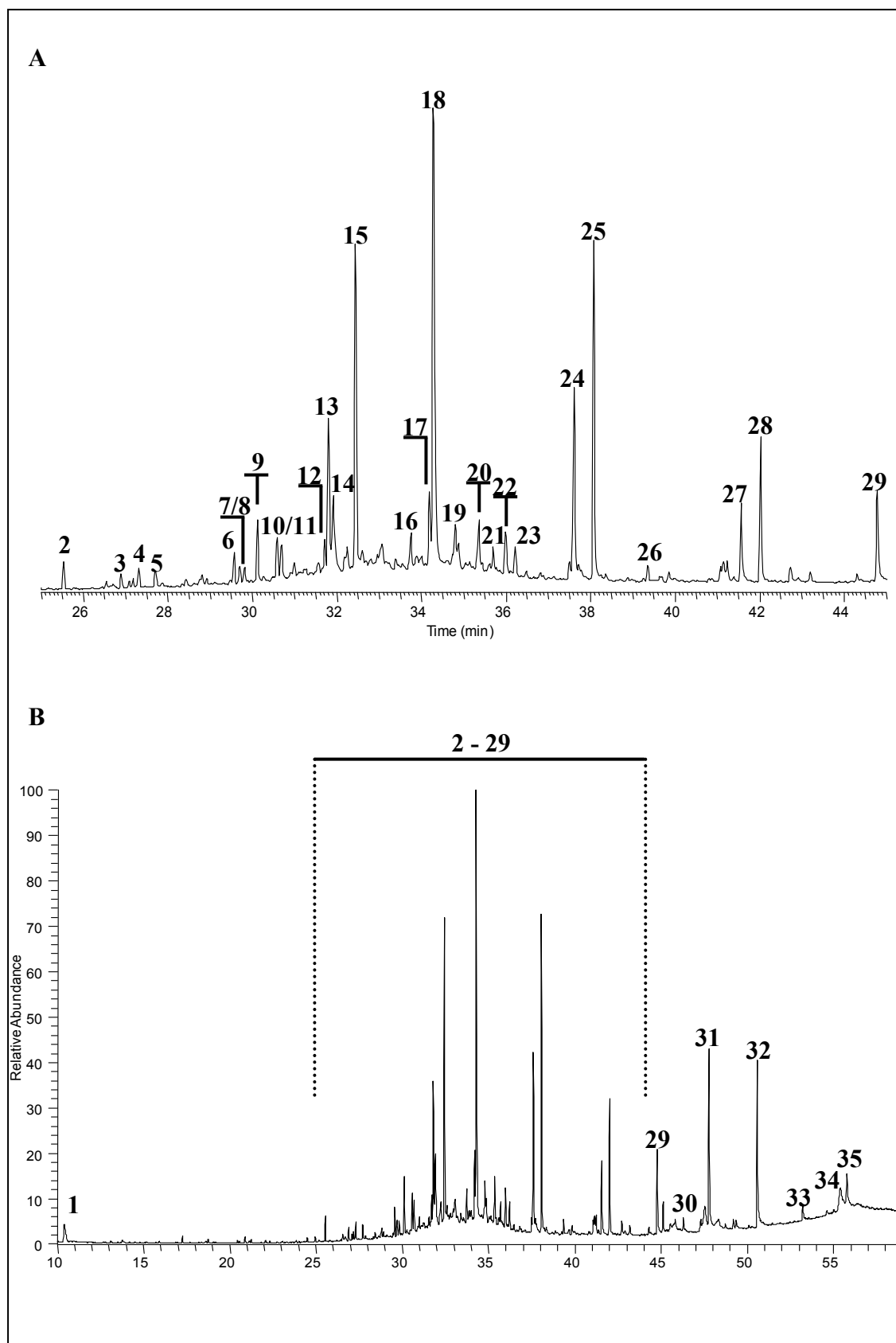


Figure 15: Chromatographic profile of the sufraction n-hexane/ethyl acetate (7:3) obtained by GC/MS (B) and expansion on the retention time 25 to 45 minutes (A). Peaks: 8, 13, 14, 17, 20, 34 and 35 – terpene (sub-group not identified); 10 - sesquiterpenes; 28 – diterpene; 2, 9, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 31, 32 and 33 – methyl ester of long chain carboxylic acid.

4 – Discussion

Considering that histamine release by mast cells is a key event in allergic responses (Amin, 2012; Abrahan and Hofmann, 2010; Kim *et al.*, 2013; Sipos *et al.*, 2012), their inhibition can be an important approach for the treatment of allergic diseases. The drugs used in allergic reactions have limitations and thereby the interest for substances which inhibit the release of this mediator has increased (Sipos *et al.*, 2012). This way, in previous studies we evaluated some species from Cerrado (Brazilian Savannah) and Tropical Atlantic Forest and its ability to inhibit histamine secretion induced by ionophore A23187 and compound 48/80. The results showed that the crude metabolic extract of the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* (ME) inhibited 97 and 100% histamine release induced respectively by ionophore A23187 and by compound 48/80. Thus, the present study was realized a bioassay-guided fractionation through the inhibitory activity *in vitro* of this extract on the histamine release in peritoneal mast cells of male Wistar rats challenged by the ionophore A23187. Additionally, the most active fraction was evaluated in peritoneal mast cells challenged by the compound 48/80, then in mast cells sensitized with OVA in order to most closely simulate what happens in allergic reactions.

The models used for the evaluation and development of drugs should be carefully selected so that they can be a predictive of disease and effectiveness in humans (Arnett and Viney, 2007). Currently, *in vitro* assays are widely used in research for new drugs, primarily due to questions about the use of animals and the possibility of assessing the biological activity of the extract and / or active constituents using small amount of plant material. However, *in vitro* assays have been questioned in some studies because it does not ensure that the effect also occurs *in vivo*, especially considering no pharmacokinetic aspects of the studied compounds (Houghton *et al.*, 2007). Even with these disadvantages, *in vitro* model used in this study allowed the evaluation of the effects of the fractions from ME on the histamine release induced by secretory compounds, using a small number of animals and a small quantity of plant material, directly on cells involved in immediate hypersensitivity reactions, in this case rat peritoneal mast cells, allowing the selection of the most active fraction for evaluation in a more specific model and to identify potential constituents responsible for the activity.

After the partition of ME three fractions were obtained from ME. The hexane fraction (P1) increased histamine release (Fig. 2) while ethyl acetate (P2) was the most active (Fig. 3). When we compared the inhibitory activity of P2 with the ME activity (previously

evaluated), it is concluded that the initial fractionation maintained a high inhibitory activity on histamine release induced by both secretory compounds. It is important to note that the hydroalcoholic fraction showed significant inhibitory activity at lower concentrations (Fig. 4). However, it is known that plants of the genus *Hymenaea* have high concentrations of tannins (Rodrigues-Orsi *et al.*, 2012), polar compounds at higher amounts in the hydroalcoholic and could be complexed with secretory compounds interfering in the results. Thus, based on the results, the fraction P2 was chosen for evaluation in a model of OVA sensitization and fractionation by liquid chromatography under vacuum (VLC).

When evaluated on OVA sensitized mast cells sensitized, the inhibitory effect of P2 was superior to sodium cromoglycate both at same concentrations (Fig. 11).

Fractionation of P2 by VLC produced several sub-fractions with activity. All of them, except sub-fractions P2F were able to inhibit histamine release induced by ionophore A23187, highlighting the sub-fraction P2C that did not increased the spontaneous release of histamine, showed the highest inhibitory activity on histamine release in mast cells challenged by ionophore A23187 and when evaluated in mast cells challenged with compound 48/80 also showed high inhibitory effect.

It is known that the regulation of intracellular Ca^{++} is a key event for releasing not only histamine but also arachidonic acid derivatives and numerous inflammatory cytokines that are secreted upon activation of mast cells (Kashiwakura *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Shin, 2010). The secretory compounds used in our experiments promote increased levels of intracellular Ca^{++} , simulating what occurs when activation of $Fc\epsilon R$ receptor by IgE. Compound 48/80 acts by binding to receptors coupled to the G protein on the surface of mast cells, which enhances the activity of tyrosine kinase with consequent increase in intracellular Ca^{++} and mast cell degranulation through phospholipase C and D (Palomaki and Laitinen 2006.) On the other hand the ionophore A23187 acts as a carrier of Ca^{++} to the intracellular environment and also increases the release of Ca^{++} by organelles (Gomes *et al.*, 1994).

Plants of genus *Hymenaea* were claimed possess diterpenes (Domenech-Carbó *et al.*, 2009; Jayaprakasam *et al.*, 2007). Phytochemical analysis of *H. courbaril* showed the presence of procyanidins (Sasaki *et al.*, 2009), while the *H. stigonocarpa* were identified terpenes (Domenech-Carbó *et al.*, 2009; Jayaprakasam *et al.*, 2007; Langenheim *et al.*, 1983), flavonoids (Langenheim *et al.*, 1983; Rodrigues Orsi *et al.*, 2012), condensed tannins (Rodrigues Orsi *et al.*, 2012), and sterols (Langenheim *et al.*, 1983).

In our work, the phytochemical analysis showed that P2 and its sub-fractions have different terpenes. Several terpenes isolated from plant species have been evaluated and their antiallergic activity corroborated with several other studies. It is known that triterpene derivatives such as oleanolic acid and kaurenoic acid are able to prevent allergic and inflammatory reactions in the skin by inhibiting mast cell degranulation (Choi *et al.*, 2013). Silva *et al.*, (2012) using a model of skin sensitization observed that a mixture of triterpenes was able to inhibit the pruritus produced by histamine. Moreover, the authors show that the triterpene mixture inhibited the histamine release induced by compound 48/80. Choi *et al.*, (2013) demonstrated that oral administration of acetyl oleanolic acid, a derivative of oleanolic acid and a terpene derivative, decrease histamine levels in a model of atopic dermatitis in mice. Cho *et al.*, (2010) evaluated the effect of diterpenes in a model of asthma and observed decreased of histamine release. Park *et al.*, (2002) after isolating a triterpene glycoside showed that it inhibits the histamine release induced by ionophore A23187. Additionally, with respect to phytosterols, Nirmal *et al.*, (2012), demonstrated that the extract obtained from *Solanum nigrum*, in which the β -sitosterol was the major compound, was able to prevent the mast cell degranulation and Yuk *et al.*, (2007) showed that lactose- β -sitosterol decrease the concentration of OVA-specific IgE on sensitized animals. It is known that histamine release depend on the increase in intracellular Ca^{++} . In this sense a sesquiterpene evaluated by Hong *et al.*, (2011) on sensitized mast cells was able to inhibit degranulation induced by IgE and by ionophore A23187 though inhibiting the increase of intracellular Ca^{++} . Additionally, *Inula japonica* extract, mainly constituted by triterpene, was able to inhibit mast cell degranulation (Lu, et al. 2012). Thus, it is possible that the terpenes are responsible for the activity showed by P2 and its fractions. Such activity may be related to inhibiting the increase in intracellular levels of Ca^{++} .

Besides terpenes, in sub-fractions from P2 were identified fatty acids. It is known that the production and release of mediators from mast cells depend on the lipid composition of the membrane (Basiouni *et al.*, 2012; Gueck *et al.*, 2004, Weise *et al.*, 2013), and several studies have shown that lipid alterations may interfere the release of mediators from mast cells, including histamine. In fact, Di Stasi *et al.*, (1999) to fractionate extracts of *Anchietia salutaris* identified fatty acids that showed inhibitory activity on histamine release. Gueck *et al.*, (2004), evaluated the effect of eicosapentaenoic acid and arachidonic acid (eicosatetraenoic acid) in cultured of canine matocytoma cell line observed that when cells were stimulated with mastoparan, histamine release was lower in the cells incubated with

eicosapentaenoic acid in comparison with arachidonic acid. In a study evaluating the effect of various saturated and unsaturated fatty acids on the release of histamine in basophils cell line, Teshima *et al.*, (2007) propose that variations in the number and position of unsaturation could interfere with the release of histamine. Additionally, Basiouni *et al.*, (2012) propose that changes in fatty acid composition of the membrane would lead to changes that influence its properties such as fluidity, permeability and even the binding domains such as receptor FcεR. It is valid to point out that in some studies cited above, the mast cells were incubated for eight days before evaluation. Fatty acids identified in fractions of P2 may have contributed to the inhibitory effect on histamine release. However, it is important to highlight that the incubation period used in our protocol was 20 minutes, so these acids may not have been incorporated in the membrane of mast cells.

5 – Conclusion

In this study, we demonstrated that P2 was able to inhibit the histamine release by ionophore A23187, compound 48/80 and antigen (OVA). Additionally terpenes, and long chain fatty acids were identified as major compounds. Thus, this study corroborates many others that demonstrate the activity of these groups of metabolites as inhibitors of histamine release, and confirm the potential use of *Hymenaea stigonocarpa* in the treatment of allergic diseases as well as use thereof as a source for obtaining novel compounds that inhibit histamine release.

References

- Amin K: **The role of mast cells in allergic inflammation.** *Respiratory medicine* 2011, **106**(1): 9–14.
- Arnett HA, Viney JL: **Considerations for the sensible use of rodent models of inflammatory disease in predicting efficacy of new biological therapeutics in the clinic.** *Adv Drug Deliv Rev* 2007, **59**(11): 1084–92.
- Basiouni S, Stöckel K, Fuhrmann H, Schumann J: **Polyunsaturated fatty acid supplements modulate mast cell membrane microdomain composition.** *Cell Immunol* 2012, **275**(1-2): 42–6.
- Busse WW: **The role of allergy in disease.** *Immunol Rev* 2011, **242**(1): 5–9.

- Cho JH, Lee JY, Sim SS, Whang, WK, Kim CJ: **Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs.** *Pulm Pharmacol Therap* 2010, **23**(3): 190–9.
- Choi JK, Oh H-M, Lee S, Park J-W, Khang D, Lee SW, Lee WS, Rho MC, Kim S-H: **Oleanolic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2013, **269**(1): 72-80
- Di Stasi LC, Gomes LC, Vilegas V: **Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of *Anchientia salutaris* var. *martiana* (Violaceae).** *Chem Pharml Bull* 1999, **47**: 890-893.
- Doménech-Carbó MT, De la Cruz-Cañizares J, Osete-Cortina L, Doménech-Carbó A, David H: **Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart.** *Int J Mass Spectrom* 2009, **284**(1-3): 81–92.
- Ferreira, C. A. C.; Sampaio, P. de T. B. 1999. Jatobá *Hymenaea courbaril*. In: **Clay, J. W.; Sampaio, P. de T. B.; Clement, C. R. *Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização*.** Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. Manaus, Amazonas. 409pp.
- Gueck T, Seidel A, Fuhrmann, H: **Consequences of eicosapentaenoic acid (n-3) and arachidonic acid (n-6) supplementation on mast cell mediators.** *J Anim Physiol Anim Nutr* 2004, **88**: 259–265.
- Gomes JC, Di Stasi, LC, Sgarbosa F, Barata LES: **Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchientia salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig.** *Int Arch Allergy Immunol* 1994, **103**:188–193.
- Grandi TSM, Trindade JA, Pinto, MJF, Ferreira LL, Catella AC: **Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil.** *Acta Botânica Brasileira* 1989, **3**(2): 185-223.
- Hofmann AM, Abraham SN: **New Roles for Mast Cells in Modulating Allergic Reactions and Immunity Against Pathogens.** *Curr Opin Immunol* 2010, **21**(6): 679–686.
- Hong J, Aoyama S, Hirasawa N, Zee O, Ishihara K, Hashida C, Kimura M, Seyama T, Ohuchi K: **Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide.** *Planta Med* 2011, **77**(3): 252–6.
- Houghton PJ, Howes M, Lee CC, Steventon G: **Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant** *J Ethnopharmacol* 2007, **110**: 391–400.
- Huber M: **Activation/Inhibition of mast cells by supra-optimal antigen Concentrations.** *Cell communication and signaling* 2013, **11**(1), 1-11.
- Jayaprakasam B, Alexanderlindo R, Dewitt D, Nair M: **Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities.** *Food Chem* 2007, **105**(2), 485–490.

- Kim H-H, Bae Y, Kim S-H: **Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation.** *Food Chem Toxicol* 2013, *in press*.
- Langenhein JH, Hall GD: **Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocane*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil.** *Biocheml Sys Ecol* 1983, **11**: 29–36.
- Li X: **Treatment of Asthma and Food Allergy With Herbal Interventions From Traditional Chinese Medicine.** *MT Sinai J Med* 2011, **78**:697–716.
- Lima FL, Azevedo KS, Campos CAS, Taveira US, Rocha AA: **Manejo da seiva do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por famílias tradicionais na reserva extrativista Chico Mendes, Acre, Brasil,** *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil 2007*, 1–3.
- Lu Y, Li Y, Jin M, Yang JH, Li X, Chao GH, Park H-H, Park Y.N., Son J.K, Lee E, Chang H.W: ***Inula japonica* extract inhibits mast-cell-mediated allergic reaction and mast cell activation.** *J Ethnopharmacol* 2012, **143**:151-157.
- Nirmal SA, Patel AP, Bhawar SB, Pattan SR: **Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma.** *J Ethnopharmacol* 2012, **142**: 91-97.
- Palomaki VAB, Laitinen JT: **The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT1A receptors in rat brain sections.** *Br J Pharmacol* 2006, **147**(6): 596-606.
- Pan Y-F, Dong L-W, Wang M, Yang G-Z, Zhang J, Li S-X, Zhang B, Yang C, Li Z, Tan Y, Wang H: **Signal regulatory protein α negatively regulates mast cell activation following Fc ϵ RI aggregation.** *Euro J Immunol* 2013 *in press*.
- Park KH, Park J, Koh D, Lim Y: **Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma.** *Phytother Res* 2002, **16**(4): 359–63.
- Rodrigues Orsi P, Bonamin F, Aparecida Severi J, Cássia Santos R, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Di Stasi LC: ***Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models.** *J Ethnopharmacol* 2012, **143**:1–10.
- Sasaki K, Matsukura Y, Shijima K, Miyake M, Fujiwara D, Konishi Y: **High-Performance Liquid Chromatographic Purification of Oligomeric Procyanidins, Trimers up to Nonamers, Derived from the Bark of Jatoba (*Hymenaea courbaril*).** *Biosci Biotechnol Biochem* 2009, **73**(6): 1274–1279.
- Shin TY: **Anti-allergic inflammatory activity if the fruit of *Prunus persica*: Role of calcium and NF-kB.** *Food Chem Toxicol* 2010, **48**: 2797-2802.
- Silva MR, Silva MS, Martins KA, Borges S: **Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares.** *Ciênc Tecnol Aliment* 2001, **21**(2), 176–182.

- Silva LL, Gomes BS, Souza-Neto BP, Oliveira JPC, Ferreira ELF, Chaves MH, Oliveira FA: **Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae in a mouse model of pruritus.** *J Ethnopharmacol* 2012, **139**: 90-97.
- Sipos W, Reutterer B, Frank M, Unger H, Grassauer A, Prieschl-Grassauer E, Doerfler P: **Escin Inhibits Type I Allergic Dermatitis in a Novel Porcine Model.** *Int Arch Allergy Immunol* 2012, **161**(1): 44-52.
- Teshima R, Amano F, Nakamura R, Tanaka Y, Sawada J-I: **Effects of polyunsaturated fatty acids on calcium response and degranulation from RBL-2H3 cells.** *Int Immunopharmacol* 2007, **7**: 205-210.
- Weise C, Ernst D, Van Tol EAF, Worm M: **Dietary polyunsaturated fatty acids and non-digestible oligosaccharides reduce dermatitis in mice.** *Pediatr Allergy Immunol* 2013, 1-7.
- Yang Y, Oh JM, Heo P, Shin JY, Kong B, Shin J, Lee JC, Oh JS, Park KW, Lee CH, Shin YK, Kweon DH: **Polyphenols differentially inhibit degranulation of distinct subsets of vesicles in mast cells by specific interaction with granule-type-dependent SNARE complexes.** *The Biochem J* 2013, **450**(3): 537-46.

CAPÍTULO 5
Considerações finais

No presente trabalho foi utilizado um modelo *in vitro* para avaliação do efeito das frações e subfrações do extrato metanólico bruto da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* (ME) sobre a liberação de histamina. Apesar de não considerar os aspectos farmacocinéticos, o modelo *in vitro* utilizado permite a utilização de um pequeno número de animais e reduzida quantidade de material vegetal, sendo uma estratégia importante para o fracionamento biomonitorado de um determinado extrato, facilitando a seleção de frações e/ou subfrações mais ativas, as quais posteriormente podem ser estudadas em modelos *in vivo*. Nossos resultados mostraram que a fração acetato de etila (P2) foi a que apresentou maior atividade. Essa fração, na concentração de 100 µg/mL inibiu em 78%, 97% e 85% a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187, composto 48/80 e antígeno (OVA) respectivamente. Por ser a mais ativa, a fração P2 foi submetida a cromatografia líquida sob vácuo, produzindo oito subfrações que foram monitoradas por CCD e agrupadas em seis subfrações. Todas as subfrações foram avaliadas quanto a atividade inibitória sobre a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187. Com exceção da P2F, todas as subfrações da P2 apresentaram atividade inibitória, com destaque para a P2C que, dentre as subfrações apresentou o maior efeito inibitório sobre a liberação de histamina, inibindo em 74 e 84% a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187 e composto 48/80 respectivamente.

Se por um lado, o fracionamento de um extrato pode concentrar um determinado componente ativo, aumentando assim a atividade biológica, por outro, caso ocorra sinergismo entre os componentes de um extrato, a atividade biológica poderá diminuir após o fracionamento. Em estudos preliminares, mostramos que o extrato inibiu em 97% e 100% a liberação de histamina induzida pelo ionóforo A23187 e composto 48/80 respectivamente (Ferreira et al., 2013 – Capítulo 1). Os estudos posteriores mostraram que o fracionamento ainda manteve uma elevada atividade inibitória sobre a liberação de histamina (fração P2), mesmo considerando que uma discreta atividade inibitória também foi detectada na fração P3. Quando foi realizado o fracionamento da fração P2, verificamos que a atividade biológica se manteve em diferentes níveis de inibição em cinco das seis subfrações obtidas, sendo que a subfração P2C foi aquela que apresentou maior porcentagem de inibição da liberação de histamina. Estes resultados mostram que o fracionamento não priorizou os componentes ativos em uma única fração, sugerindo a presença de diferentes compostos com atividade inibitória.

A análise fitoquímica das subfrações mais ativas da P2 mostrou a presença de ácidos graxos de cadeia longa e diversos grupos de terpenos (diterpenos, sesquiterpenos e esteróis), os quais podem ser reconhecidos como os responsáveis pela atividade determinada. Estudos demonstram que os referidos grupos de terpenos possuem atividade inibitória sobre a liberação de histamina por inibirem o aumento de Ca^{++} intracelular no mastócito, enquanto que os ácidos graxos de cadeia longa podem atuar ao serem incorporados nos lipídios da membrana mastocitária para produzirem seus efeitos.

Com base nos dados apresentados, podemos concluir que:

1. O fracionamento biomonitorado mostrou-se como uma estratégia importante na identificação das frações mais ativas, assim como permitiu a identificação dos principais constituintes químicos ativos como inibidores da liberação de histamina;
2. A atividade biológica detectada está relacionada à presença de diferentes compostos, especialmente terpenos e ácidos graxos de cadeia longa;
3. O extrato metanólico bruto, assim como a fração P2 podem ser utilizados como fitoterápicos para o tratamento de doenças onde a histamina possui papel chave, visto que possuem importante atividade biológica e marcadores químicos que permitem seu controle de qualidade, sendo apenas necessária a realização de estudos *in vivo* e de segurança;
4. Os dados de fitoquímica permitem que a fração P2 e a subfração P2C possam ser utilizadas no isolamento de compostos com atividade inibitória da liberação de histamina, potencialmente úteis para a produção de novos fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, K., The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory medicine**, v. 106, n. 1, p. 9–14, 2011.
- BIERLORY L. Complementary and alternative interventions in asthma, allergy and immunology. **Annals of Allergy Asthma & Immunol.**, v. 93, n. 2, p. 545-554, 2004.
- CHANG, H.C.; GONG, C.C.; CHEN, J.L.; MAK, O.T. Inhibitory effects of inhaled complex traditional Chinese medicine on early and late asthmatic responses induced by ovalbumin in sensitized guinea pigs. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2011.
- DI STASI L.C. Uma proposta de ação interdisciplinar na pesquisa de novos medicamentos a partir de plantas medicinais. *In* Di Stasi LC eds. **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. Fundação Editora Unesp, São Paulo, 217-230, 1995.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental health perspectives** v. 109 (Suppl), p. 69–75, 2001.
- GSCHWANDTNER, M.; MILDNER, M.; MLITZ, V.; GRUBER, F.; ECKHART, L.; WERFEL, T.; GUTZMER, R. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. **Allergy**, v. 68, n. 1, p. 37–47, 2013.
- HIROTA, N.; RISSE, P.-A.; NOVALI, M.; MCGOVERN, T.; AL-ALWAN, L.; MCCUAIG, S.; PROUD, D.; HAYDEN, P.; HAMID, Q.; MARTIN, J.G. Histamine may induce airway remodeling through release of epidermal growth factor receptor ligands from bronchial epithelial cells. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1704–1716, 2012.
- HOFMANN, A.M.; ABRAHAM, S.N. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 6, p. 679-86, 2009.
- HOUGHTON, P. J.; HOWES, M.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant, v.110, p. 391–400, 2007.
- HUBER, M. Activation/Inhibition of mast cells by supra-optimal antigen concentrations., **Cell communication and signaling: CCS**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2013.
- IZIQUÉ, C. Ações contra a biopirataria: OMPI estuda medidas para proteger culturas e recursos genéticos, **Pesquisa Fapesp**, v. 75, p. 14-17, 2002.
- KASHIWAKURA, J.; ANDO, T.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, M.; KITaura, J.; MATHO, M. H.; ZAJONC, D. M.; OZEKI, T.; RA, C.; MACDONALD, S.M.; SIRAGANIAN, R.P.; BROIDE, D.B.; KAWAKAMI, Y.; KAWAKAMI, T. Histamine-

- releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. **Peptides**, v. 122, n. 1, p. 218-228, 2012.
- KIM, S.H.; PARK, S.B.; KANG, S.M.; JEON, H.; LIM, J.P.; KWON, T. K.; PARK, W.H.; KIME, H.M.; SHIN, T.Y. Anti-allergic effects of *Teucrium japonicum* on mast cell-mediated allergy model. **Food and chemical toxicology**, v. 47, n. 2, p. 398–403, 2009.
- KIM, H.; DWYER, L.; SONG, J. H.; MARTIN-CANO, F. E.; BAHNEY, L. P.; BRITTON, F. C.; SANDERS, K. M.; KOH, S.D. Identification of histamine receptors and effects of histamine on murine and simian colonic excitability. **Neurogastroenterology Motility**, v. 23, n. 10, p.1–18, 2011.
- KIM, H.; SONG, M.J. Traditional Plant-Based Therapies for Respiratory Diseases Found in North Jeolla Province, Korea. **Journal of alternative and complementary medicine**, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2012.
- KIM, H.-H.; BAE, Y.; KIM, S.-H. Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. **Food and chemical toxicology**, v. 57, p. 209-216, 2013.
- KOVATS, E. The retention index sistem. In: Giddings, J. C.; Keller, R. A. eds. **Advances in Chromatography**, v. 1, Marcel Dekker, Inc. New York, p. 229-247, 1965.
- LEE, E.; HAA, K.; YOON, J. M.; JIN, M. H.; SEO, C. S.; SON, K. H.; KIM, H. P.; BAE, K.H.; KANG, S.S.; SON, J.K.; CHANG, H.W. Anti-asthmatic activity of an ethanol extract from *Saururus chinensis*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 2, p. 211–215, 2006.
- LIMSUWAN, T.; DEMOLY, P. Acute symptoms of drug hypersensitivity (Urticaria, angioedema, anaphylaxis, anaphylactic shock). **The Medical Clinics of North America**, v. 94, p. 691-710, 2010.
- NAGASHIMA, Y.; KAKO, K.; KIM, J.-D.; FUKAMIZU, A. Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase expression by phorbol ester in Jurkat cells. **Molecular medicine reports**, v. 6, n. 5, p. 944–948, 2012.
- OKAYAMA, Y.; SAITO, H.; RA, C. Targeting human mast cells expressing g-protein-coupled receptors in allergic diseases. **Allergology international**, v. 57, n. 3, p. 197–203, 2008.
- OLIVEIRA, R. B. DE; VINÍCIUS, M.; NASCIMENTO, M.; VALADARES, M. C.; PAULA, J. R. DE; COSTA, E. A.; CARLOS, L. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax . e de suas frações em camundongos albinos, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n.3, p. 485-491, 2008.
- O'MAHONY, L.; AKDIS, M.; AKDIS, C.A. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 128, n. 6, p. 1153–1162, 2011.

- PARK, H.H.; LEE, S.; SON, H.Y.; PARK, S.B.; KIM, M.S.; CHOI, E.J.; SINGH, T. S. K.; HA, J.H.; LEE, M.G.; KIM, J.E.; HYUM, M.C.; KWON, T.K.; KIM, Y.H.; KIM, S.H. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. **Archives of pharmacal research**, v. 31, n. 10, p. 1303–1311, 2008.
- PASSALACQUA, G.; BOUSQUET, P. J.; CARLSEN, K.-H.; KEMP, J.; LOCKEY, R. F.; NIGGEMANN, B.; PAWANKAR, R.; PRICE, D.; BOUSQUET, J. ARIA update: I-- Systematic review of complementary and alternative medicine for rhinitis and asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 117, n. 5, p. 1054–62, 2006
- ROSENWASSER, L. J. Mechanisms of IgE Inflammation. **Curr Allergy Asthma Rep**, v11, p. 178–183, 2011.
- SALINAS, E.; QUINTANAR-STEPHANO, A.; CÓRDOVA, L. E.; OUINTANAR, J. L. Allergen-sensitization increases mast-cell expression of the exocytotic proteins SNAP-23 and syntaxin 4, which are involved in histamine secretion. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 18, n. 5, p. 366–371, 2008.
- SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; COHN, V.H. A method for the fluorometric assay of histamine tissue. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 127, p. 182-190, 1959.
- SICHERER, S.; LEUNG, D. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2012. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 1, p. 55–66, 2012.
- SIPOS, W.; REUTTERER, B.; FRANK, M.; UNGER, H.; GRASSAUER, A.; PRIESCHL-GRASSAUER, E.; DOERFLER, P. Escin Inhibits Type I Allergic Dermatitis in a Novel Porcine Model. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 161, n. 1, p. 44–52. 2012.
- SIRIGANIAN, R.P. An automated continuous-flow system for the extractions and fluorometric analysis of histamine. **Analytical Biochemistry**. v. 57, p. 383-394, 1974.
- SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. Histamine, bradykinin and their antagonists. *In* BRUNTON L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (eds.) **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. McGraw-Hill, New York, USA, 11th edition, 629-651, 2006.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of Retention Index System including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.
- WADSWORTH, S.; SIN, D.; DORSCHIED, D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. **Journal of asthma and allergy**, v. 4, p. 77–86, 2011.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97–110, 2009.

WELLER, C. L.; COLLINGTON, S. J.; WILLIAMS, T.; LAMB, J. R. Mast cells in health and disease. **Clinical science**, v. 120, n. 11, p. 473–484, 2011.

YANG, Y.; OH, J.M.; HEO, P.; SHIN, J. Y.; KONG, B.; SHIN, J.; LEE, J.C.; OH, J.S.; PARK, K.W.; LEE, C.H.; SHIN, Y.K.; KWEON, D.H. Polyphenols differentially inhibit degranulation of distinct subsets of vesicles in mast cells by specific interaction with granule-type-dependent SNARE complexes. **The Biochemical journal**, v. 450, n. 3, p. 537–46, 2013.