



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO FARMACOQUÍMICO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE
MIORRELAXANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE
Hymenaea courbaril L. (JATOBÁ)**

GABRIELI DA PENHA BEZERRA

FORTALEZA – CE

2013

GABRIELI DA PENHA BEZERRA

**ESTUDO FARMACOQUÍMICO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE
MIORRELAXANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE
Hymenaea courbaril L. (JATOBÁ)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago

FORTALEZA – CE

2013

GABRIELI DA PENHA BEZERRA

**ESTUDO FARMACOQUÍMICO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE
MIORRELAXANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE
Hymenaea courbaril L. (JATOBÁ)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Gilvandete Maria Pinheiro Santiago (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a Dr^a Nirla Rodrigues Romero

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Universidade Federal do Ceará – UFC

*À minha família, em especial, meus pais
Jesus e Rosa,
pelo exemplo de luta, entrega e amor incondicional*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

À minha orientadora, prof^a Dra. Gilvandete M^a Pinheiro Santiago, por ter me aceitado como sua aluna, pela orientação, atenção e confiança sobre mim depositada, além da amizade construída ao longo desses dois anos.

À prof^a Dra. Nirla Rodrigues Romero pela co-orientação, por tornar esse trabalho possível, pelo amor distribuído gratuitamente no nosso dia a dia, pelas conversas e conselhos, pelo exemplo de pessoa e profissional.

À prof^a Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira, por ter me recebido em seu laboratório, pelo exemplo de luta e dedicação constantes.

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, por também ter me recebido tão prontamente em seu laboratório e pela contribuição científica que só engrandecem esse trabalho.

Aos amigos do LSO, que sempre foram muito acolhedores e que muito ajudaram na parte química deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Farmacognosia Regional que aguentaram durante esse tempo os meus pedidos de organização, frequência, cobranças da nossa famosa cotinha. Obrigada por, junto comigo, tentarem fazer com que o nosso laboratório se tornasse um verdadeiro ambiente de trabalho e, sobretudo, de amizade. Agradecimento em especial à Wellyda, que muito me ensinou enquanto fazia suas CCDs preparativas, intermináveis tentativas de isolar as famosas chalconas diméricas.

À Lívia Porto, Anderson Lima e Camilla Mateus, pela ajuda no laboratório. Espero que vocês tenham aprendido alguma coisa nesse tempo que me acompanharam.

Aos amigos do LAFARMULI, em especial Teresinha e Franzé, que abraçaram o meu projeto como se fosse deles, sempre prontos para me ensinar e ajudar em tudo o que fosse preciso, como nas longas horas e horas destinadas a solubilização da amostra.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos transmitidos.

À Raimundinha e Silésia pela paciência e disposição pra ajudar.

Ao Diego e Saul pela amizade, amor e companhia para além do laboratório, por sempre conseguirem arrancar um sorriso meu mesmo nos dias mais difíceis.

À Mariana, Emanuel e ao Rob pela amizade recém-construída, mas de fundamental importância para aguentar os dias complicados de elaboração da dissertação.

Ao Jean, pelo amor e amizade desde a época da graduação e que continua apesar da distância. Pelo exemplo de que vale a pena persistir num sonho.

À minha segunda família, Lizi, João Victor e Victor. Por estarem presentes em absolutamente todos os momentos da minha vida, dividindo todos os fardos e todas as alegrias.

Agradecimento mais que especial aos meus pais por sempre acreditarem em mim e respeitarem as minhas decisões (Amo vocês!). Aos meus irmãos, pelo aprendizado e maturidade adquiridos no tempo em que moramos juntos e aos meus sobrinhos Enzo, Cael e os trigêmeos Rafael, Miguel e Gabriel, por me fazerem sentir um amor que eu nunca imaginei que pudesse ter.

À FUNCAP pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

*Tem vez que as coisas pesam mais
Do que a gente acha que pode aguentar
Nessa hora fique firme
Pois tudo isso logo vai passar*

Felicidade é só questão de ser

Felicidade – Marcelo Jeneci

RESUMO

Estudo farmacológico bioguiado pela atividade miorelaxante do extrato etanólico das cascas do caule de *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá). Gabrieli da Penha Bezerra. Orientadora: Gilvandete Maria Pinheiro Santiago. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Ceará, 2013.

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae), conhecida popularmente como "Jatobá", é usada na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias tais como bronquite e asma. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de *H. courbaril* na contratilidade da musculatura lisa traqueal de ratos, bem como seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, através de um estudo farmacológico bioguiado pela atividade miorelaxante do extrato etanólico das cascas do caule (EEHC). O tratamento cromatográfico de EEHC resultou em frações de polaridade crescente denominadas hexano (FH), hexano:diclorometano (FHD), diclorometano (FD), diclorometano:acetato de etila (FDAE), acetato de etila (FAE) e metanol (FM). EEHC, FD, FDAE, FAE e FM apresentaram potencial antioxidante através da atividade sequestradora de radicais livres, determinado pelo teste do DPPH. EEHC, FD, FDAE e FM relaxaram parcialmente anéis de traqueia contraídos com CCh ou K^+ , enquanto FAE se mostrou mais bioativa, revertendo completamente as contrações induzidas por esses agentes. FAE reduziu contrações que dependiam do influxo de cátions bivalentes através de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCs) ou canais de Ca^{2+} operados por receptor (ROCs), sendo mais potente em inibir as contrações dependentes de VOC, em meio sem Ca^{2+} e na presença de acetilcolina, evidenciando sua ação inibitória preferencial em eventos iniciados eletromecanicamente. O pré-tratamento de animais com FAE por via oral preveniu a hiperresponsividade das vias aéreas às contrações induzidas por KCl em traqueias de animais desafiados à ovalbumina, bem como reduziu a quantidade de células brancas, em especial, eosinófilos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de animais sob processo asmático. A prospecção dos constituintes químicos da fração mais bioativa (FAE) foi realizada utilizando métodos cromatográficos e obtenção de espectros de RMN de 1H e ^{13}C , resultando no isolamento e caracterização do flavonóide astilbina e do ácido oleanólico, um composto triterpenóide isolado pela primeira vez do gênero *Hymenaea*. Astilbina apresentou atividade relaxante sobre músculo liso traqueal de ratos pré-contraídos com K^+ , sendo responsável, pelo menos em parte, pela atividade apresentada por FAE. O presente estudo forneceu base científica de que *H. courbaril* apresenta potenciais atividades antioxidante, miorelaxante e

anti-inflamatória, respaldando o seu uso na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas, tais como a asma.

Palavras-chave: *Hymenaea courbaril* L.. Atividade miorreaxante. Antioxidante. Anti-inflamatório

ABSTRACT

Phytochemical study bioguided by the myorelaxant activity of the crude extract from stem bark of *Hymenaea courbaril* L (Jatobá). Gabrieli da Penha Bezerra. Advisor: Gilvandete Maria Pinheiro Santiago. Máster Degree. Program of Pos-Graduation in Pharmaceutical Sciences. Department of Pharmacy. Federal University of Ceará, 2013.

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae), popularly known as "Jatoba", is used in folk medicine to treat respiratory diseases such as bronchitis and asthma. This study evaluated the effect of *H. courbaril* on the contractile of rat isolated trachea, as well as its potential antioxidant and anti-inflammatory, through an interdisciplinary study bioguided by myorelaxant activity of the ethanol extract from stem bark (EEHC). Chromatographic fractionation of EEHC resulted in fractions of increasing polarity: hexane (HF), hexane:dichloromethane (HDF), dichloromethane (DF), dichloromethane:ethyl acetate (DEAF), ethyl acetate (EAF) and methanol (MF) fraction. EEHC, DF, DEAF, EAF and MF showed enhanced free radical scavenging in the DPPH test. EEHC, DF, DEAF and MF partially relaxed tracheal rings contracted with either CCh or K^+ , while EAF almost abolished such contractions. EAF was more potent to inhibit K^+ than CCh-induced contractions. EAF reduced contractions that depended on divalent cation inflow through voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCCs) or receptor-operated Ca^{2+} channels (ROCCs), but it was more potent to inhibit VOCC- than ROCC-dependent contraction in ACh-enriched Ca^{2+} -free medium, indicating a preferential action in events mediated electromechanically. Oral pre-treatment of antigen-challenged animals with EAF prevented airways hyperresponsiveness on KCl-induced contractions and impaired the increase in the number of white cells, particularly eosinophils and neutrophils in bronchoalveolar lavage of these animals. Chemical investigation of the most bioactive fraction (EAF) was performed using chromatographic methods and 1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopic analysis, resulting in the isolation and identification of the flavonoid astilbin and oleanolic acid, a compound triterpenoid, which is isolated by the first time in *Hymenaea*. Astilbin showed myorelaxant activity on rat trachea rings contracted with K^+ , indicating that it may be partly responsible for the activity presented by EAF. This study provided scientific basis that *H. courbaril* presents potential antioxidant, anti-inflammatory and myorelaxant, which support its use in folk medicine to treat inflammatory airway diseases such as asthma.

Key-words: *Hymenaea courbaril* L.. Myorelaxant activity. Antioxidant. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de um espécime de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	25
Figura 2 - Partes aéreas de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	26
Figura 3 - Frutos e endocarpo de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	26
Figura 4 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados da resina e das sementes de <i>H. courbaril</i>	29
Figura 5 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados do epicarpo do fruto e das folhas de <i>H. courbaril</i>	30
Figura 6 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados da resina da casca do caule e da casca do caule de <i>H. courbaril</i>	31
Figura 7 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados do extrato metanólico de <i>H. courbaril</i>	32
Figura 8 - Estruturas dos constituintes químicos identificados nos óleos essenciais das cascas dos frutos verdes e das cascas dos frutos maduros de <i>H. courbaril</i>	33
Figura 9 - Fluxograma de metodologias desenvolvidas no estudo.....	48
Figura 10 - Fluxograma de fracionamento do EEHC, obtenção de frações e isolamento de constituintes químicos.....	51
Figura 11 - Sistema utilizado nos ensaios de contratilidade <i>in vitro</i> em traqueia de ratos.....	57
Figura 12 - Detalhe da montagem de anéis de traqueia de rato no sistema de contratilidade <i>in vitro</i>	58
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo utilizado para avaliação do efeito de FAE em modelo experimental que mimetiza o processo asmático	61
Figura 14 - Estrutura química de HCC-4.....	67
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz; CD ₃ OD) de HCC-4	69
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz; CD ₃ OD) de HCC-4.....	69
Figura 17 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz; CD ₃ OD) de HCC-4.....	70
Figura 18 - Espectro de RMN ¹³ C DEPT 135° (125 MHz; CD ₃ OD) de HCC-4	70
Figura 19 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H – COSY de HCC-4.....	71

Figura 20 - Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-4.....	71
Figura 21 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC-4.....	72
Figura 22 - Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC4.....	72
Figura 23 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-4.....	73
Figura 24 - Expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-4.....	73
Figura 25 - Expansão 2 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-4.....	74
Figura 26 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz; CD_3OD) de HCC-4	74
Figura 27 - Estrutura química de HCC-5.....	76
Figura 28 - Espectro de RMN - ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HCC-5.....	78
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN - ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HCC-5	78
Figura 30 - Espectro de RMN - ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5	79
Figura 31 – Expansão 1 do espectro de RMN - ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5.....	79
Figura 32 – Expansão 2 do espectro de RMN - ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5.....	80
Figura 33 - Espectro de RMN - ^{13}C DEPT 135° (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5	80
Figura 34 - Expansão do espectro de RMN - ^{13}C DEPT 135° (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5.....	81
Figura 35 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-5	81
Figura 36 - Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-5.....	82
Figura 37 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC-5.....	82
Figura 38 - Expansão 1 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC-5	83

Figura 39 - Expansão 2 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC-5	83
Figura 40 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-5.....	84
Figura 41 - Expansão 1 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-5	84
Figura 42 - Expansão 2 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-5	85
Figura 43 - Efeito do EEHC sobre a contração induzida por CCh (A) ou K^+ (B) em traqueia isolada de rato.....	88
Figura 44 - Efeito de FD, FDAE, FAE e FM sobre a contração induzida por CCh ou K^+ em traqueia isolada de rato.....	90
Figura 45 - Efeito da adição de K^+ ao banho contendo tecido traqueal de rato após a sua exposição à EEHC ou FAE	91
Figura 46 - Efeito de astilbina (HCC-4) sobre a contração induzida por K^+ em traqueia isolada de rato.....	92
Figura 47 - Efeitos de FAE nas contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso traqueal na presença de ACh (10μM) e verapamil (10μM).....	95
Figura 48 - Efeitos de FAE nas contrações induzidas por Ba^{2+} em músculo liso traqueal na presença de ACh (10μM).....	97
Figura 49 - Curvas concentração-efeito ao KCl em traqueias isoladas de ratos sensibilizados, desafiados e desafiados pré-tratados com FAE	99
Figura 50 - Efeito do pré-tratamento com FAE na resposta migratória de células inflamatórias em ratos desafiados à ovalbumina	100
Figura 51 - Efeito do pré-tratamento com FAE em animais desafiados à OVA sobre a contagem diferencial de células (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos) presentes no LBA de ratos.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEHC	49
Tabela 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FAE.....	52
Tabela 3 - Dados referentes às subfrações obtidas do fracionamento cromatográfico da FAE.....	52
Tabela 4 - Dados referentes às subfrações obtidas do tratamento cromatográfico da fração solúvel em acetona de FAE 180-189	53
Tabela 5 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FAE 79-95.....	54
Tabela 6 - Dados referentes às subfrações do fracionamento cromatográfico da FAE 79-95	54
Tabela 7 - Perfil fitoquímico da casca do caule de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	65
Tabela 8 - Dados espectroscópicos de HCC-4 comparados com aqueles descritos na literatura (LUCAS-FILHO <i>et al.</i> , 2010) para astilbina.....	68
Tabela 9 - Dados espectroscópicos de HCC-5 comparados com aqueles descritos na literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) para ácido oleanólico	77
Tabela 10 - Avaliação da atividade antioxidante do EEHC e suas frações usando o método de sequestro do radical DPPH	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCE	Curva concentração-efeito
CCh	Carbacol
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CL ₅₀	Concentração letal 50%
COX	Ciclooxigenase
COSY	Correlation Spectroscopy
DAG	Diacilglicerol
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DES	Animais desafiados com ovalbumina
DFAE	Animais desafiados e pré-tratados com fração acetato de etila
DPPH	Radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila
EEHC	Extrato etanólico das cascas do caule de <i>Hymenaea courbaril</i>
EGTA	Ácido etileno glicol O'-bis(2-aminoetil)-N, N, N', N' -tetracetico
Eo	Eosinófilo
E.P.M	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
FAE	Fração Acetato de etila
FD	Fração diclorometano
FDAE	Fração diclorometano:acetato de etila
FH	Fração hexano
FHD	Fração hexano: diclorometano
FM	Fração metanol
GC	Guanilato ciclase
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRB	Hiperresponsividade brônquica
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IgE	Imunoglobulina E
i.p	Intraperitoneal
IP ₃	Inositoltrifosfato

IR	Importância relativa
LBA	Lavado broncoalveolar
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso
LDH	Lactato desidrogenase
Lf	Linfócito
Ltda	Limitada
Mg	Macrófago
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nt	Neutrófilo
OVA	Ovalbumina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PMN	Polimorfonucleares
Ppm	Partes por milhão
q.s.p	Quantidade suficiente para
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
ROC	Canal de cálcio operado por receptor
SENS	Sensibilizados
SOC	Canal de cálcio operado por estoque
TNF- α	Fator de Necrose tumoral- α
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
VOC	Canal de cálcio operado por voltagem

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$	Porcentagem
Φ	Diâmetro
L	Comprimento
δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Pesquisa com plantas medicinais: Contribuição ao conhecimento químico e biológico da biodiversidade brasileira	21
1.2 Gênero <i>Hymenaea</i>	23
1.3 <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	24
1.3.1 Distribuição geográfica, aspectos botânicos e etnofarmacológicos	24
1.3.2 Aspectos químicos	27
1.3.3 Farmacologia e toxicologia pré-clínica	33
1.4 Músculo liso das vias aéreas	34
1.5 Papel do músculo liso, inflamação e estresse oxidativo no processo asmático.....	37
2 JUSTIFICATIVA.....	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 METODOLOGIA	46
4.1 Materiais	46
4.1.1 Material vegetal	46
4.1.2 Animais	46
4.1.3 Drogas, reagentes e solventes	46
4.1.3.1 Composição das soluções	47
4.1.4 Equipamentos.....	47
4.1.5 Outros materiais.....	47
4.1.6 Aspectos éticos	48
4.2 Métodos	48
4.2.1 Protocolos experimentais para caracterização química de <i>H. courbaril</i>	49
4.2.1.1 Prospeção química	49

4.2.1.2	<i>Obtenção do extrato etanólico da casca do caule e frações</i>	49
4.2.1.3	<i>Isolamento e caracterização de constituintes químicos</i>	50
4.2.1.4	<i>Fracionamento cromatográfico de FAE 180-189 e isolamento de HCC-4</i>	52
4.2.1.5	<i>Fracionamento cromatográfico de FAE 79-95 e isolamento de HCC-5</i>	53
4.2.2	<i>Protocolo experimental para avaliação do potencial antioxidante</i>	55
4.2.2.1	<i>Avaliação do potencial antioxidante do EEHC e frações através do teste do DPPH</i>	55
4.2.3	<i>Protocolos experimentais para estudo do potencial miorrelaxante e antiespasmódico em tecido traqueal de ratos</i>	56
4.2.3.1	<i>Experimentos com anéis de traqueia</i>	56
4.2.3.2	<i>Avaliação do efeito da adição in vitro de EEHC, frações e astilbina sobre CCE induzida por CCh ou KCl</i>	59
4.2.3.3	<i>Avaliação do efeito da adição in vitro de FAE na CCE induzida por Ca²⁺ em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca²⁺ e na presença de acetilcolina</i>	59
4.2.3.4	<i>Avaliação do efeito da adição in vitro de FAE na CCE induzida por Ba²⁺ em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca²⁺ e na presença de acetilcolina</i>	60
4.2.3.5	<i>Avaliação do efeito de FAE em traqueia de ratos desafiados com antígeno</i>	61
4.2.3.5.1	<i>Sensibilização e bronco-provocação antigênica de ratos</i>	61
4.2.3.5.2	<i>Efeito da administração oral de FAE na curva concentração-efeito induzida por KCl</i>	62
4.2.4	<i>Protocolo experimental para avaliação preliminar do potencial antiinflamatório</i>	62
4.2.4.1	<i>Avaliação do efeito de FAE sobre o acúmulo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos desafiados com antígeno</i>	62
4.3	<i>Análise estatística</i>	63
5	RESULTADOS	65
5.1	<i>Estudo químico <i>Hymenaea courbaril</i> L.</i>	65
5.1.1	<i>Prospecção química</i>	65
5.1.2	<i>Isolamento e caracterização de constituintes de FAE</i>	66

5.1.2.1 Determinação estrutural de HCC-4	66
5.1.2.2 Determinação estrutural de HCC-5	75
5.2 Estudo das atividades biológicas de <i>H. courbaril</i> L.	86
5.2.1 Avaliação da atividade antioxidante do EEHC e suas frações através do teste do DPPH	86
5.2.2 Efeito da adição <i>in vitro</i> de EEHC, frações ou astilbina na contração induzida por CCh ou KCl em músculo liso traqueal de rato	87
5.2.3 Efeito de FAE na curva concentração-efeito ao Ca^{2+} em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina	94
5.2.4 Efeito de FAE na curva concentração-efeito ao Ba^{2+} em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina	96
5.2.5 Efeito de FAE na CCE induzida por KCl em traqueias isoladas de ratos desafiados ao antígeno sensibilizante	98
5.2.6 Efeito de FAE na migração de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de ratos desafiados à ovalbumina	100
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	117
ANEXO	128

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pesquisa com plantas medicinais: Contribuição ao conhecimento químico e biológico da biodiversidade brasileira

O uso de plantas medicinais como ferramenta de cura passou por diversas transformações ao longo da história. Utilizadas inicialmente de forma empírica, a partir do vasto conhecimento repassado por gerações, as plantas medicinais tornaram-se objeto de estudo de pesquisas científicas, levando a uma série de possíveis aplicações práticas, que permitem diferentes percepções sobre esse instrumento terapêutico, das quais podemos ressaltar o mapeamento da composição química de plantas, a busca de novas moléculas bioativas, a avaliação quantitativa do potencial químico de uma área, a quantificação de biodiversidade, bem como a formação de uma base de dados essenciais para o planejamento do uso sustentável de recursos naturais (GOTTLIEB *et al.*, 1998; LEITE, 2009).

A biodiversidade brasileira constitui importante fonte desses recursos e os compostos químicos oriundos do metabolismo secundário vegetal podem ser caracterizados como uma janela de oportunidades de utilização para a indústria de medicamentos, que pode encontrar nas plantas medicinais novas estruturas químicas a serem descobertas e, diante disso, desenvolver fármacos que serão alternativas biológicas terapêuticas eficazes para o tratamento ou prevenção de patologias (VILLAS BOAS; GADELHA, 2007; CALIXTO, 2005).

No entanto, para que o homem possa conhecer, lidar e apropriar-se desse recurso natural e reverter a aquisição do saber em tecnologia utilizável, é necessário que seja desenvolvida uma interdisciplinaridade envolvendo todos os conhecimentos da cultura popular e científica (VASCONCELLOS *et al.*, 2002). Muitas áreas estão envolvidas na realização da pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas medicinais como a fitoquímica, que estuda o isolamento e caracterização de compostos químicos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, que se baseiam em informações obtidas do conhecimento popular; e a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos de extratos, frações e compostos isolados (MACIEL *et al.*, 2002; MENDONÇA-FILHO; MENEZES, 2003; VENDRUSCULO; RATES; MENTZ, 2005). A multidisciplinaridade desses estudos revela a sua grandiosidade e a integração de diferentes áreas e conduz a um caminho eficaz para a validação das plantas medicinais (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Além disso, estudos têm demonstrado que a informação sobre novos fármacos de interesse médico e farmacêutico pode ser obtida de maneira mais efetiva quando se pesquisa de forma etnodirigida, ou seja, quando se estuda as práticas terapêuticas de diferentes povos e

culturas, selecionando espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Sendo assim, a avaliação farmacológica de extratos brutos, frações e substâncias isoladas deve seguir as indicações terapêuticas empíricas divulgadas por estudos etnobotânicos. A realização correta da seleção dos testes biológicos a serem desenvolvidos, permitirá tanto uma avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal quanto à obtenção de informações sobre a toxicidade da planta (MACIEL *et al.* 2002).

Dessa maneira, as pesquisas de bioprospecção dos nossos biomas vêm sendo incrementadas objetivando a busca racional de bioprodutos de valor agregado. Esses estudos que priorizam descobertas de protótipos de fármacos ou fitofármacos têm propiciado tanto o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, bem como, contribuído para o desenvolvimento tecnológico na realização de bioensaios e estudos fitoquímicos, proporcionando a criação de novas possibilidades na caracterização farmacêutica de produtos complexos como extratos ou frações (SIMÕES *et al.*, 2004).

O Brasil se destaca por ser o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, apresentando entre 15 a 20% da biodiversidade do planeta, constituindo dessa maneira, importante fonte desses recursos citados anteriormente (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Pesquisas relatam que mais de 90% da população brasileira faz uso de produtos farmacêuticos derivados de plantas medicinais, sendo que 46% mantem um cultivo caseiro dessas plantas. Estima-se que o mercado nacional de fitoterápicos movimente R\$ 1 bilhão por ano (ABIFISA, 2012). Esse aumento na produção e no consumo de produtos à base de plantas medicinais demanda maior rigor relativo à qualidade desses produtos. No Brasil, a legislação vigente para o registro de fitoterápicos, RDC 14/2010, exige a detecção e quantificação de marcadores, que são compostos ou classe de compostos presentes na matéria-prima vegetal que tenham, preferencialmente, correlação com o efeito terapêutico e que serão utilizados no controle da qualidade da própria matéria-prima ou do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010).

No Ceará, o uso de plantas medicinais também é parte integrante da cultura popular e como consequência dessa utilização é possível observar o crescimento na realização de diversas pesquisas multidisciplinares que tomam como foco principal as plantas medicinais da nossa região (MATOS, 2007). Dentro desse contexto, podemos destacar os projetos de pesquisas etnodirigidas realizados com *Myracrodruon urundeuva*, conhecida popularmente como “Aroeira do Sertão”, comprovando a sua eficácia como agente anti-inflamatório, anti-úlceras e cicatrizante. Dos estudos fitoquímicos com essa espécie foi possível identificar

taninos e chalconas diméricas como marcadores químicos e biológicos (BANDEIRA; MATOS; BRAZ-FILHO, 1994; BANDEIRA; MATOS; BRAZ-FILHO, 2003; VIANA *et al.*, 1997; VIANA; BANDEIRA; MATOS, 2003; SOUZA *et al.*, 2007).

Pode-se ressaltar também a *Amburana cearensis*, conhecida popularmente como “Cumaru” e o *Eucalyptus tereticornis*, “Eucalipto”, plantas regionais que tem sido alvo de pesquisas multidisciplinares voltadas para exploração dos seus efeitos anti-inflamatórios, espasmolíticos e, principalmente no tratamento da asma, tosse e bronquite (LEAL, *et al.*, 2003, 2006; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2005). Dessas plantas também foram caracterizados marcadores tais como isocampferídeo, cumarina e amburosídeo A, que são os compostos bioativos majoritários presentes na casca do caule do “Cumaru”, enquanto que o 1,8-cineol foi isolado e caracterizado como principal constituinte do óleo essencial das folhas do eucalipto medicinal (CANUTO; SILVEIRA, 2006; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2005). Esses marcadores têm sido investigados quanto aos seus efeitos farmacológicos e a eles tem sido atribuído, pelo menos em parte, a ação exercida pelas preparações farmacêuticas que utilizam essas plantas medicinais como matéria-prima. (LEAL, 2006; BASTOS *et al.*, 2009).

Dentro desse contexto, nosso grupo de pesquisa, a fim de continuar contribuindo para o conhecimento do potencial químico e biológico da flora nacional, deu início a uma série de estudos farmacocômicos com *Hymenaea courbaril* L., uma planta regional, que também tem amplo uso na medicina popular.

1.2 Gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea*, pertencente à família Fabaceae e à subfamília Caesalpinioideae, ocorre em todos os principais tipos de ecossistemas tropicais de baixa altitude e encontra-se bem distribuído pelo Brasil, ocorrendo em quase todas as regiões com distribuição uniforme na Amazônia. (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 1999, LEE; LANGENHEIM, 1975, CAMPOS; UCHIDA, 2002). Este gênero abrange 14 espécies, das quais nove são encontradas no Brasil (RIZINNI, 1971; CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 1999).

As espécies que compõe este gênero são conhecidas por apresentarem em suas composições químicas, principalmente, diterpenos do tipo *ent*-labdânicos presentes na resina e casca do caule (NAKANO; DJERASSI, 1961; CUNNINGHAM; MARTIN; LANGENHEIM, 1973; MARSAIOLI; FILHO; CAMPELO, 1975; IMAMURA *et al.*, 1977) e diterpenos *ent*-halimanos na resina do epicarpo (KHOO; OEHLISCHLAGER; OURISSON, 1973).

A maioria das espécies desse gênero possui valor econômico e fornecem madeira de alta qualidade, resinas, frutos comestíveis e cascas ricas em taninos, além de possuírem variados usos na medicina popular (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 1999).

1.3 *Hymenaea courbaril* L.

1.3.1 Distribuição geográfica, aspectos botânicos e etnofarmacológicos

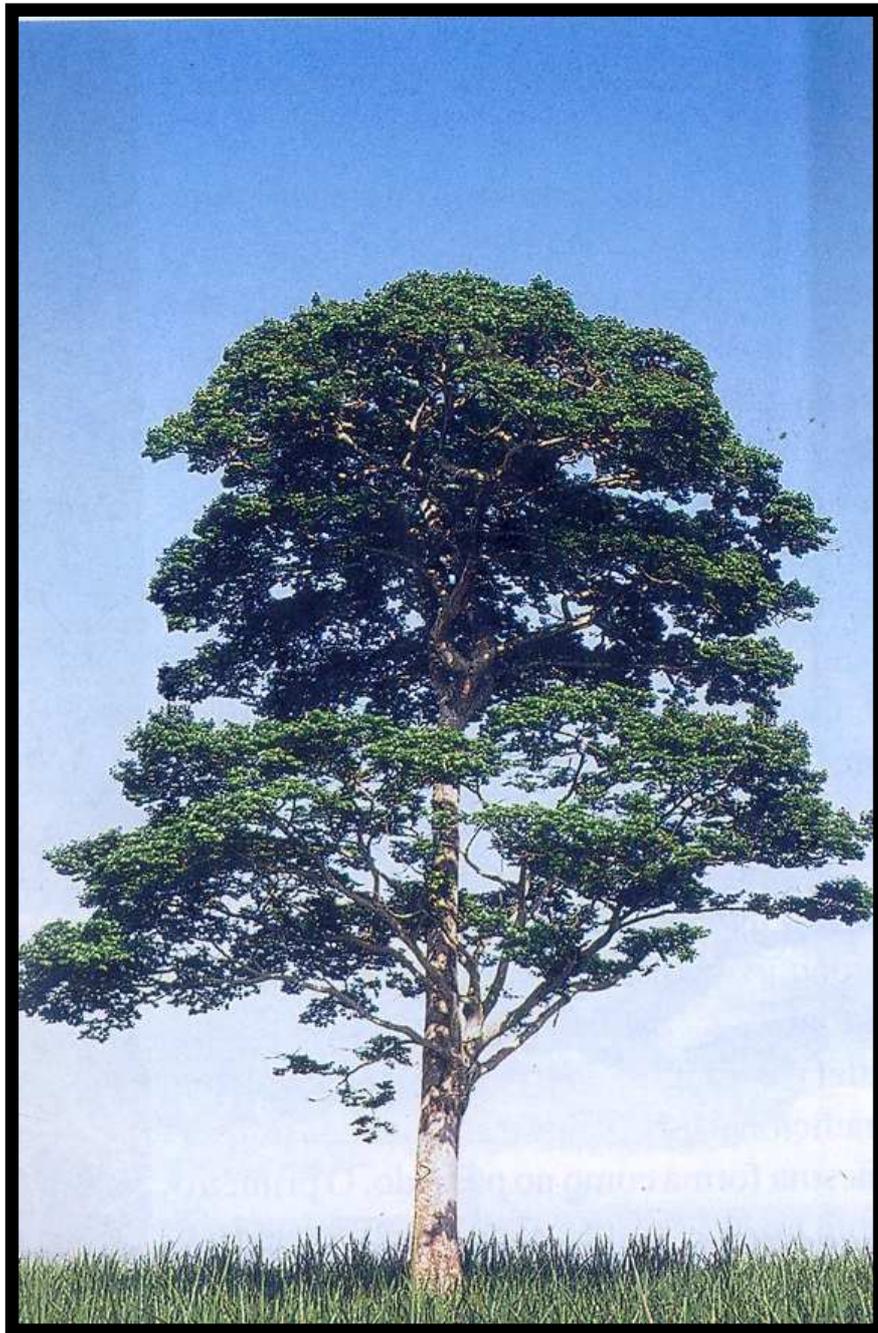
Hymenaea courbaril L. (Figura 1) é conhecida popularmente como “Árvore de Copal”, “Jatobá” ou “Juta”. Como descrito anteriormente, pertence à família Fabaceae, uma das mais abundantes famílias encontradas na Chapada do Araripe no município do Crato-Ce (ALENCAR; SILVA; BARROS, 2007).

Geralmente, mede entre 10 a 15 metros de altura, podendo ser encontradas espécimes com 40 metros de altura (LIMA *et al.*, 2007). *Hymenaea courbaril* é uma espécie vegetal de ocorrência em mata ciliar ou de várzea, em solo temporário ou permanentemente úmido, sujeito à inundação periódica e sendo ainda frequente nas matas de terra firme (SALVADOR, 1989). É também pouco exigente em fertilidade e umidade do solo (FILHO *et al.*, 2003).

É uma árvore de copa ampla e densa, com tronco mais ou menos cilíndrico de até 1 m de diâmetro. Possui folhas compostas bifoliadas de 6 a 14 cm de comprimento e flores grandes e brancas reunidas em inflorescências terminais. Seus frutos são vagens curtas de cor marrom escura, contendo 3 a 8 sementes duras envoltas por uma substância farinácea adocicada e cheiro semelhante a chulé, conforme mostrado nas Figuras 2 e 3 (LORENZI, 1992).

A polpa farinácea que envolve as suas sementes é comestível e rica em nutrientes, sendo usada como ingrediente para produção de pratos regionais e bebidas pelas populações rurais das regiões de origem da planta. Estudos demonstraram que eles são ricos em fibras e podem ser usados na preparação de lanches saudáveis (LORENZI, 1992).

Figura 1 – Foto de um espécime de *Hymenaea courbaril* L.



Fonte: LORENZI, 1992

Figura 2 - Partes aéreas de *Hymenaea courbaril* L.



Fonte: LORENZI, 1992

Figura 3 - Frutos e endocarpo de *Hymenaea courbaril* L.



Fonte: LORENZI, 1992

Esta espécie vegetal vem sendo foco de muitos estudos de natureza agrônômica e fitoquímica, pois além de possuir frutos comestíveis, madeira resistente também apresenta variados usos na medicina popular tais como no tratamento de úlceras, distúrbios intestinais, bronquites e asma (MARSALOLI; FILHO; CAMPELLO, 1975; NOGUEIRA *et al.*, 2001). Guarim Neto e Morais (2003) fizeram uma revisão bibliográfica sobre as plantas medicinais do Cerrado de Mato Grosso, tendo sido a espécie *H. courbaril*, uma das mais citadas em trabalhos etnobotânicos, etnoecológicos, taxonômicos e florísticos. De acordo com Pinto e Maduro (2003), em trabalho realizado com raizeiros da cidade de Boa Vista, estado de Roraima, o “Jatobá” está entre os produtos de origem vegetal mais procurados para fins medicinais, sendo a casca e a resina indicadas como antianêmicos, anti-inflamatório e no tratamento de problemas de próstata.

Cartaxo, Souza e Albuquerque (2010) demonstraram, após a realização de pesquisa etnofarmacológica no Ceará, que *Hymenaea courbaril*, encontra-se entre as espécies que são recomendadas para serem utilizadas em estudos de bioprospecção, tendo em vista que apresentou grande diversidade de usos na medicina popular, quando referida por informantes-chave na comunidade.

Por outro lado, no estudo etnobotânico realizado em mercados de três estados da região Nordeste, Vieira (2011), catalogou a interseção de 43 espécies de uso tradicional, sendo *Hymenaea courbaril* aquela com o segundo maior valor de importância relativa (IR), com valor igual a 1,72. É válido salientar que essa medida confere maior qualidade e valor à planta e que leva em consideração o número de sistemas corporais tratados por uma determinada espécie e o número de propriedades biológicas atribuídas a ela (BENNETT; PRANCE, 2000). Além disso, Vieira (2011) mostrou a distribuição das plantas medicinais através da interseção das espécies comercializadas por três categorias: constituintes químicos, atividade biológica e propriedade biológica curativa referida por herbanários. Entre essas espécies, podemos destacar novamente *H. courbaril*, que foi referida pelos herbanários por apresentar propriedades curativas em doenças do trato respiratório como asma, bronquite e tuberculose, além de doenças inflamatórias e diabetes.

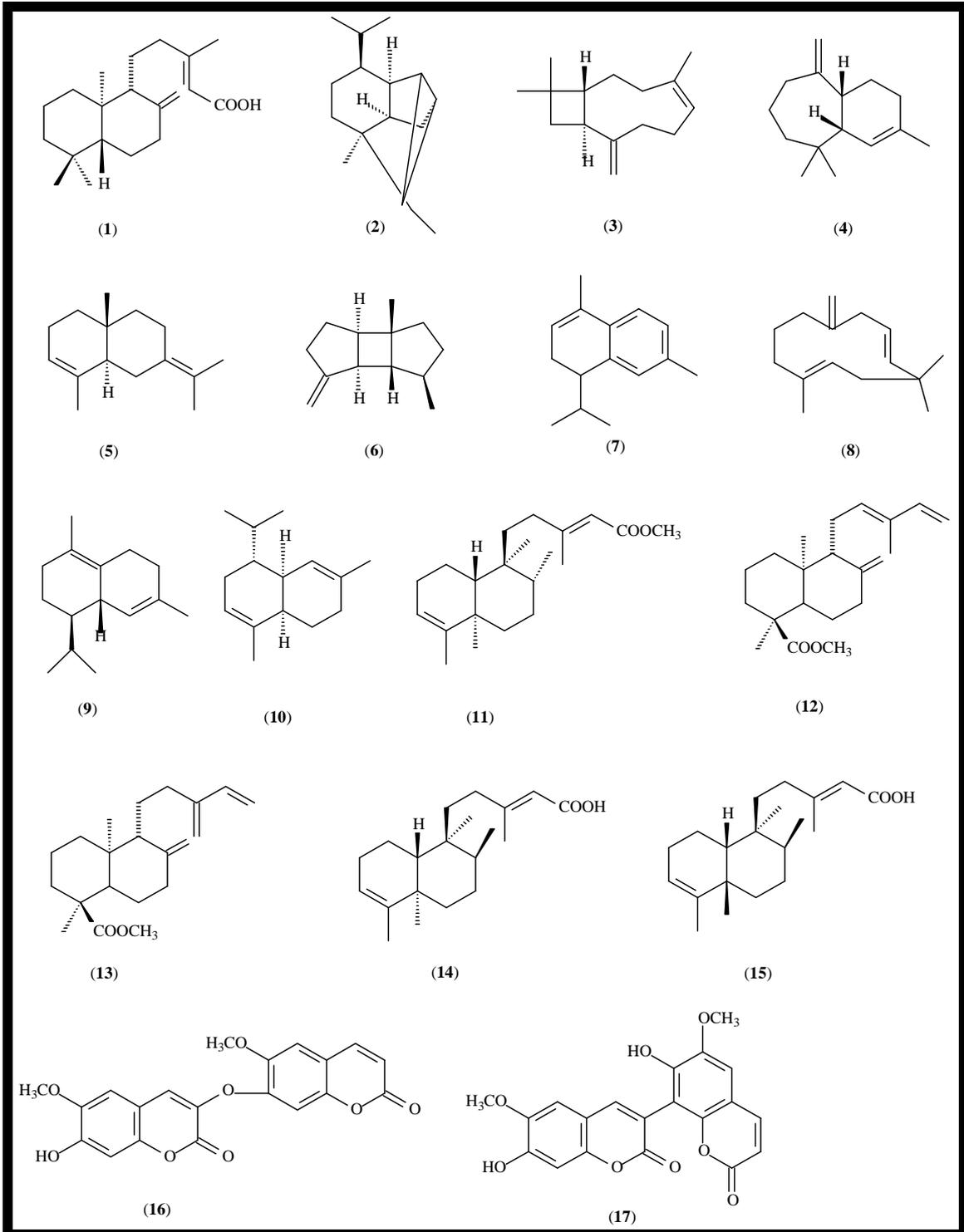
1.3.2 Aspectos químicos

Em estudos fitoquímicos realizados com *H. courbaril* L. foi possível destacar a elevada bioprodução de resinas, misturas complexas de compostos do tipo terpenóides, bem como elevada presença de taninos na casca do caule (LANGENHEIM, 1967).

Nakano e Djerassi (1961) isolaram e caracterizaram o diterpeno ácido labdan-8(17),13*E*-dien-15-óico, denominado ácido copálico (**1**) da sua resina. Das suas sementes foram isolados e identificados os sesquiterpenos ciclosativeno (**2**), β -cariofileno (**3**), α -himachileno (**4**), selina-4(14),7(11)-dieno (**5**) como constituintes majoritários, bem como β -bourboreno (**6**), α -calacoreno (**7**) humuleno (**8**), δ -cadineno (**9**), e α -muroleno (**10**) como constituintes minoritários (KHOO; OEHLSCHLAGER; OURISSON, 1973).

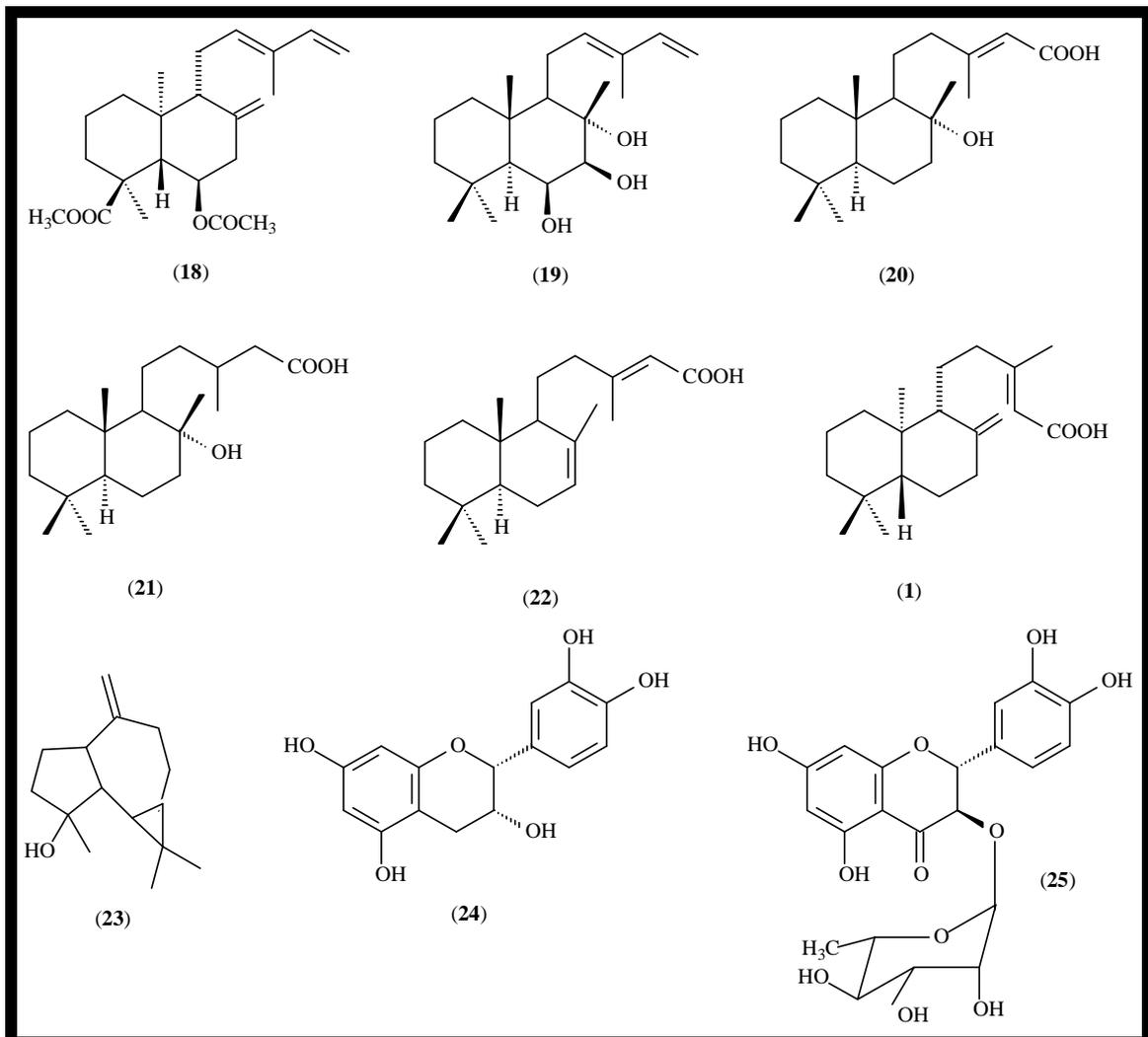
Ainda do extrato em acetato de etila das sementes de *H. courbaril*, foram isolados e identificados (-)-kovalenato de metila (**11**), (-)-ozato de metila (**12**), isoozoato de metila (**13**), ácido (-)-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13)-dien-15-dióico (**14**) e ácido (-)-(5*S*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13*E*-dien-15-dióico (**15**) (NOGUEIRA *et al.*, 2001), bem como as duas bicumarinas denominadas hymenaína (**16**) e ipomopsina (**17**) (SIMÕES *et al.*, 2009), além de um polissacarídeo com cadeia principal caracterizada por ser uma xilogalactana com substituições de xilose, arabinose e galactose (OMAIRA *et al.*, 2007). As estruturas dos metabólitos secundários isolados da resina e das sementes de *H. courbaril* encontram-se mostradas na Figura 4.

Figura 4 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados da resina e das sementes de *H. courbaril*



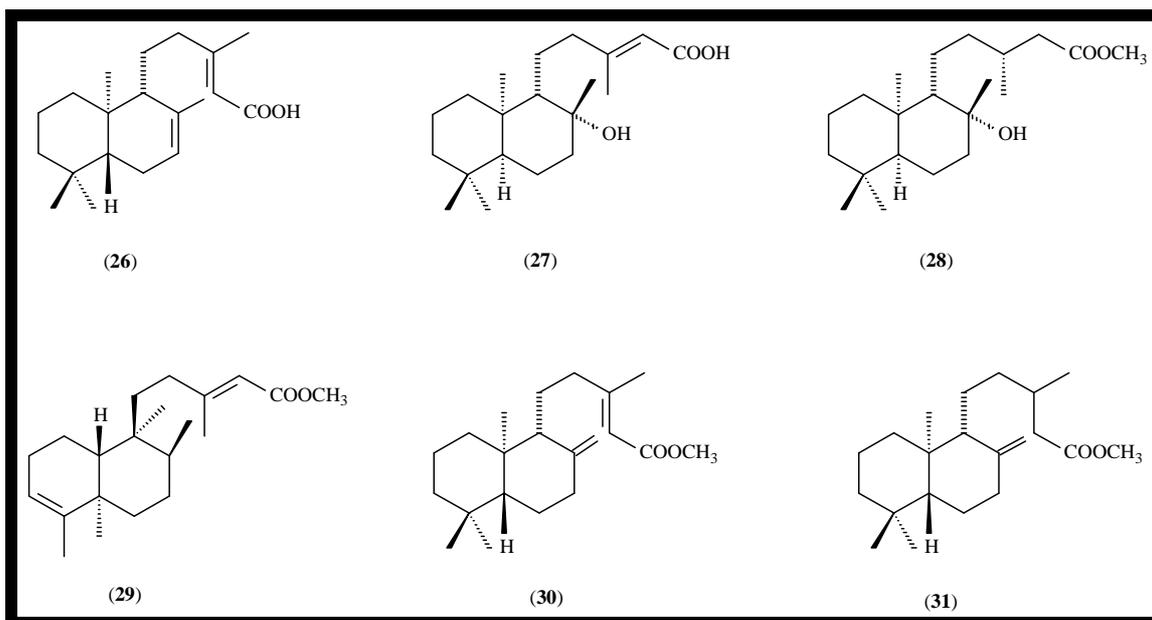
Estudos com o epicarpo do fruto levaram ao isolamento e identificação de (-)-zanzibarato de metila (**18**) (IMAMURA; MIRANDA; GIACOMINI, 2004), bem como os diterpenos labdânicos crotomaclina (**19**), ácido labdan-13*E*-en-8-ol-15-óico (**20**), ácido labdanólico (**21**), ácido labdan-13*E*-7,13-dien-15-óico (**22**), ácido labdan-8(17),13*E*-dien-15-óico (ácido copálico) (**1**) e o sesquiterpeno espatulenol (**23**) (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007). Das folhas de *H. courbaril* foram isolados a (-)-epicatequina (**24**) e o flavanonol taxifolin-3-*O*-rhaminosídeo, denominado astilbina (**25**) (ARTAVIA; BARRIOS; CASTRO; 1995), além de uma xiloglucana fucosilada (BUSATO; VARGAS-RECHIA; REICHER, 2001). As estruturas dos metabólitos secundários isolados do epicarpo do fruto e das folhas de *H. courbaril* estão mostradas na Figura 5.

Figura 5 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados do epicarpo do fruto e das folhas de *H. courbaril*



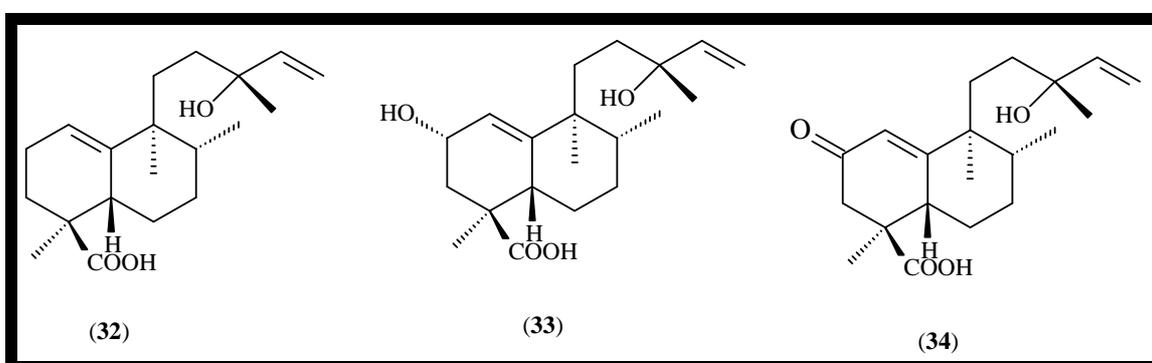
O fracionamento cromatográfico da resina da casca do caule desta espécie vegetal levou ao isolamento dos diterpenos caracterizados como ácido *ent*-labdan-7,13-dien-15-óico (**26**), ácido *ent*-labdan-13-en-8 β -ol-15-óico (**27**) (MARSAIOLI; FILHO; CAMPELO, 1975) e *ent*-labdan-8 β -ol-15-oato de metila (**28**) (IMAMURA *et al.*, 1977). Também da casca do caule foram isolados e identificados (-)-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-clerod-3-en-15-oato de metila (**29**), um novo diterpeno *ent*-clerodânico e dois diterpenos *ent*-labdânicos já conhecidos, o (-)-copalato de metila (**30**) e (-)-eperuato de metila (**31**) (NOGUEIRA *et al.*, 2002). As estruturas dos metabólitos secundários isolados da resina da casca do caule de *H. courbaril* estão mostradas na Figura 6.

Figura 6 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados da resina da casca do caule *H. courbaril*



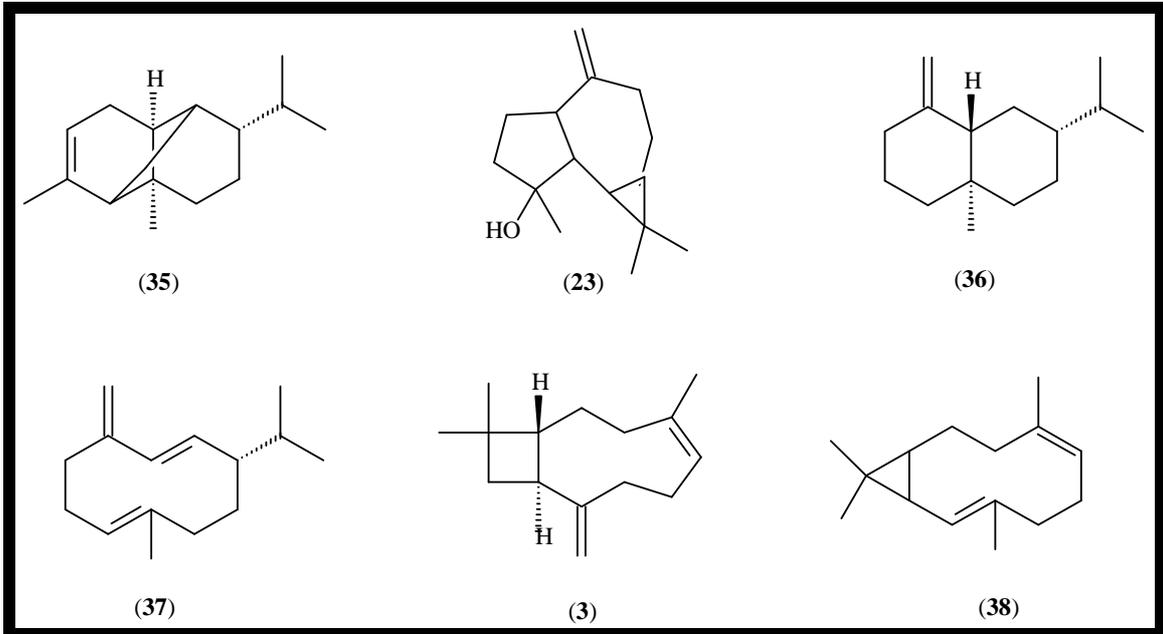
Em outro estudo, realizou-se o fracionamento guiado pela bioatividade do extrato metanólico de *H. courbaril*, resultando no isolamento e caracterização de três novos diterpenos do tipo *ent*-halimanos denominados ácido (13*R*)-13-hidróxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-óico (**32**), ácido (2*S*,13*R*)-2,13diidróxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-óico (**33**) e ácido (13*R*)-2-oxo-13-hidróxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-óico (**34**) (ABDEL-KADER *et al.*, 2002), cujas estruturas estão mostradas na Figura 7.

Figura 7 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados do extrato metanólico de *H. courbaril*



Ainda acerca dos estudos fitoquímicos realizados com *H. courbaril*, os óleos essenciais das cascas dos frutos verdes e das cascas dos frutos maduros foram analisados e as suas composições químicas foram caracterizadas. Os principais constituintes do óleo essencial das cascas dos frutos maduros foram os sesquiterpenos α -copaeno (**35**) (11,1%), espatulenol (**23**) (10,1%) e β -selineno (**36**) (8,2%), enquanto germacreno-D (**37**) (31,9%), β -cariofileno (**3**) (27,1%) e biciclogermacreno (**38**) (6,5%) foram os principais compostos do óleo essencial dos frutos verdes (AGUIAR *et al.*, 2010). As estruturas dos constituintes químicos identificados nos óleos essenciais das cascas dos frutos verdes e das cascas dos frutos maduros de *H. courbaril* estão mostradas na Figura 8.

Figura 8 - Estruturas dos constituintes químicos identificados nos óleos essenciais das cascas dos frutos verdes e das cascas dos frutos maduros de *H. courbaril*



1.3.3 Farmacologia e toxicologia pré-clínica

Ensaio preliminares conduzidos com os terpenóides obtidos do extrato metanólico dos seus frutos mostraram potentes atividades anti-inflamatória e antioxidante, que foram detectadas através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) e inibição da peroxidação lipídica, respectivamente (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

As constituições químicas dos óleos essenciais das cascas dos frutos maduros e dos frutos verdes de *H. courbaril* foram identificadas e estes óleos essenciais foram avaliados sobre larvas de *Aedes aegypti* e mostraram forte atividade larvicida com valores de CL_{50} igual $14,8 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ para os frutos maduros e $28,4 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ para os frutos verdes (AGUIAR *et al.*, 2010).

Segundo Keiji *et al.* (1999), as frações metanólica e hidroacetônica a 70% obtidas a partir do tratamento cromatográfico do extrato hidroacetônico dos frutos de *H. courbaril* mostraram, *in vitro*, elevados efeitos inibitórios sobre a tirosinase, enzima que participa do

processo de síntese da melanina. O efeito inibitório foi detectado através da supressão da formação de melanina em células B-16, linhagem derivada de melanoma de rato.

Por outro lado, o extrato etanólico das suas folhas exibiu forte atividade antiviral em ensaios realizados *in vitro* contra o rotavírus, principal agente causador de diarreia em recém-nascidos e crianças. Além disso, quando esse extrato teve a sua citotoxicidade avaliada através do exame microscópico da integridade morfológica de células tratadas comparando-as com células não-tratadas, apresentou toxicidade apenas na concentração de 5000 µg/mL (CECÍLIO *et al.*, 2012).

O diterpeno, ácido (13*R*)-13-hidróxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-óico (**35**), isolado a partir do fracionamento guiado pela bioatividade do extrato metanólico de *H. courbaril* apresentou fraca atividade citotóxica sobre linhagem de células mutantes (ABDEL-KADER *et al.*, 2002).

O estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa em parceria com o laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará utilizando o extrato etanólico da casca do caule de *Hymenaea courbaril*, demonstrou que este apresentou atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni*, parasita causador da esquistossomose, em níveis de 100 ppm/24 horas (SOUSA *et al.*, 2012).

Pode-se observar que são relatados na literatura alguns estudos que demonstram a bioatividade de soluções extrativas, frações, bem como de compostos isolados de *Hymenaea courbaril*, porém inexitem dados experimentais referentes à sua ação sobre o trato respiratório. Uma vez que esta espécie tem sido usada tradicionalmente para o tratamento de afecções respiratórias tais como a asma e tendo em vista o potencial farmacológico apresentado anteriormente por esta planta e para melhor compreender os ensaios que foram realizados no presente estudo, foi considerado importante discorrer um pouco acerca do músculo liso das vias aéreas e do papel de outros fatores no processo asmático.

1.4 Músculo liso das vias aéreas

O tecido muscular liso está presente em diversos sistemas do organismo incluindo vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga, útero e vias aéreas, dentre outros. As células musculares lisas não possuem o padrão estriado encontrado no músculo cardíaco e esquelético e recebem inervação neural do sistema nervoso autônomo, em especial o parassimpático, constituindo o principal sistema de controle motor, que medeia a broncoconstrição. Vários aspectos da função das vias aéreas estão sob controle autônomo: tônus do músculo liso, secreção das glândulas submucosas, função das células epiteliais, o tônus vascular,

permeabilidade brônquica, e, provavelmente, a secreção a partir de mastócitos e outras células inflamatórias (BARNES, 1986; PENDRY, 1993; WEBB, 2003). Além disso, o estado contrátil da musculatura lisa também é controlado por hormônios, agentes autócrinos e parácrinos, bem como por outros sinais químicos locais (WEBB, 2003).

O músculo liso, como sinalizado anteriormente, possui padrão diferente quanto às suas dimensões físicas, organização, resposta a estímulos contráteis, características de inervação e função, dependendo do órgão em que se encontra. Entretanto, didaticamente, esse tecido é classificado em dois tipos principais, o multiunitário e o unitário, sendo este último, o padrão encontrado nas vias aéreas. Essas fibras denominadas unitárias ocorrem, em geral, em feixes ou camadas e suas membranas celulares são aderentes entre si, possuindo diversos pontos de adesão denominados junções abertas, pelos quais ocorre o fluxo de íons de uma célula a outra, fazendo com que a força gerada por uma fibra muscular seja prontamente transmitida à seguinte e, dessa maneira, todas as fibras musculares se contraíam a um só tempo (GUYTON; HALL, 2011).

A contração nesse tipo de tecido pode ser estimulada por diversos tipos de sinais, tais como estimulação da fibra nervosa para a fibra muscular lisa, estimulação hormonal, estiramento da fibra ou alteração no ambiente químico. Esses sinais são responsáveis por desencadear mecanismos de ativação através do íon Ca^{2+} . O aumento na concentração de Ca^{2+} livre no sarcoplasma, citoplasma de células musculares lisas, promovido por qualquer estímulo contrátil citado anteriormente, resulta na ligação desse íon a calmodulina, uma proteína reguladora que, após reagir com quatro íons Ca^{2+} ativa a miosina quinase, enzima responsável por fosforilar as cadeias leves de miosina, permitindo a sua fixação ao filamento de actina, resultando na contração muscular (GUYTON; HALL, 2011). Em algumas células do músculo liso, a fosforilação da cadeia leve de miosina é mantida em um nível baixo mesmo na ausência de estímulos externos e essa atividade resulta no chamado tônus do músculo liso e a sua intensidade pode variar (WEBB, 2003).

A cadeia de processos que liga um estímulo a seus efeitos na modificação da concentração de Ca^{2+} no citoplasma é denominada acoplamento excitação-contração (STEPHENS, 2002). Dois mecanismos principais controlam esse acoplamento na musculatura lisa: a cascata de sinalização mediada pela alteração na concentração intracelular de Ca^{2+} e a via de sinalização da Rho-quinase, que atua através de uma alteração na sensibilidade do sistema contrátil ao Ca^{2+} . Enquanto este último parece estar mais envolvido com função modulatória, existe uma grande variação no mecanismo de sinalização mediado pelo Ca^{2+} e, por isso, esse processo será mais discutido adiante (BERRIDGE, 2008).

O aumento na concentração do Ca^{2+} livre no citoplasma pode se dar através do meio extracelular, por meio de canais de membrana, ou através de estoques intracelulares por meio do retículo sarcoplasmático (PUTNEY; McKAY 1999). Os canais presentes na membrana, pelos quais o cálcio entra através do meio extracelular são classificados de acordo com o tipo de estímulo ativador, sendo divididos em canais de cálcio operados por voltagem (VOC), ativados por variações no potencial de membrana e canais operados por receptor (ROC), onde a ocupação de receptores por agonistas específicos confere-lhe um estado de ativação. A depleção de estoques intracelulares de cálcio ativa outro tipo de canal presente na membrana plasmática, canais para cálcio operados por estoques (SOC), que são permeáveis a este íon e possibilitam a recarga dos estoques de cálcio do retículo através da entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOMLYO *et al.*, 1999; STEPHENS, 2002; PAREKH; PUTNEY, 2005).

A regulação do tônus do músculo liso traqueal é feita por um sinal extracelular que provoca resposta celular de força através de dois tipos gerais de transdução de sinal: 1. Acoplamento eletromecânico: a contração do músculo liso é obtida pelo aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma através da ativação de VOCs, que se dá pela despolarização da membrana provocada por estímulos químicos ou elétricos. 2. Acoplamento farmacomecânico: a contração do músculo liso é obtida pelo aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular através da ativação de ROCs. Esse mecanismo envolve a ativação de receptores e encontra-se relacionado a uma mínima ou inexistente despolarização da membrana (SOMLYO *et al.*, 1999; STEPHENS, 2002).

As contrações evocadas por altas concentrações de K^+ são mediadas via acoplamento eletromecânico, unicamente por efeitos voltagem-dependentes. Em concentrações altas de potássio a membrana do tecido de músculo liso traqueal é despolarizada e, em seguida são ativados os VOCs, que causam um influxo de cálcio através da membrana. Tal influxo medeia a liberação de cálcio induzida por cálcio pelo retículo sarcoplasmático, o qual resulta no desenvolvimento de força e a contração (KIRKPATRICK; JENKINSON; CAMERON, 1975). Por outro lado, a ligação de agonistas como o carbacol, aos receptores presentes na membrana promove a sua ativação através de acoplamento farmacomecânico (SOMLYO *et al.*, 1999). Uma vez estimulado o receptor, a proteína G se cliva, ativando a fosfolipase C (PLC), que ativada, hidrolisa o fosfoinosítídeo da membrana celular produzindo pelo menos dois segundos mensageiros: o diacilglicerol (DAG) e o inositoltrifosfato (IP_3). A ligação do IP_3 a receptores específicos na membrana do retículo sarcoplasmático resulta na liberação de Ca^{2+} para o citosol (WEBB, 2003; PAREKH; PUTNEY, 2005).

Em contrapartida, o relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de substâncias que estimulem a inibição do mecanismo contrátil. Independente disso, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração celular do Ca^{2+} e o aumento na atividade da miosina fosfatase, enzima capaz de remover o fosfato da cadeia leve de miosina, cessando a contração. O sarcolema contém Ca, Mg-ATPases que proporcionam um mecanismo adicional para a redução da concentração desse íon na célula. A inibição dos canais de cálcio voltagem-dependentes e operados por receptor também promovem o relaxamento do músculo liso (WEBB, 2003).

O comportamento anormal do músculo liso das vias aéreas está relacionado a uma série de doenças, entre elas, a asma brônquica. Pesquisadores tem se dedicado a identificar as características bioquímicas e biofísicas desse tecido, para melhor compreender como se dá a sua alteração no processo asmático (WEBB, 2003).

1.5 Papel do músculo liso, inflamação e estresse oxidativo no processo asmático

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta crianças e adultos, é considerada um problema mundial de saúde, acometendo cerca de 20 milhões de indivíduos aqui no Brasil. Em 2011, o Departamento de informática do Sistema Único de Saúde registrou 160 mil hospitalizações, dado que colocou essa doença como a quarta causa de internações, gerando um impacto sobre os recursos disponíveis e utilizados pelo sistema de saúde (SBPT, 2012). Santos *et al.*, 2007 mostraram que a falta de controle da asma foi o maior componente relacionado à utilização dos serviços de saúde, visto que o custo direto com a asma, englobando utilização de serviços de saúde e medicamentos, foi o dobro entre pacientes com asma não controlada que entre aqueles com asma controlada, aumentando proporcionalmente com a gravidade da doença.

Assim como outras síndromes, a asma apresenta características específicas que se apresentam em uma extensão variável nos indivíduos afetados. São elas: Inflamação aguda e crônica das vias aéreas, alteração estrutural da parede celular das vias aéreas, hiperreatividade das vias aéreas a estímulos inespecíficos ou a agonistas farmacológicos, e episódios agudos recorrentes de obstrução do fluxo aéreo, que podem ser revertidos por broncodilatadores que relaxam o músculo liso das vias aéreas. A reversibilidade da limitação do fluxo aéreo é uma das principais características do processo asmático e a demonstração de resposta terapêutica a broncodilatadores é um fator que contribui para o diagnóstico clínico (KUMAR, 2001; AN *et al.*, 2007).

Alguns pacientes asmáticos apresentam queda da função pulmonar de caráter irreversível ao longo do tempo, além de apresentarem alteração persistente da função pulmonar, apesar de estarem sem manifestações clínicas da doença (PEAT; WOOLCOCK; CULLEN, 1987; LANGE *et al.*, 1998).

A hiperreatividade ou hiperresponsividade brônquica (HRB) caracterizada pela contração excessiva das células do músculo liso das vias aéreas é um dos fatores desencadeantes do processo asmático e contribui para o aumento da resistência do fluxo aéreo, devido à ocorrência de hipersecreção e alteração na espessura do tecido. Embora o mecanismo que contribui para HRB ainda seja incerto, é possível afirmar que envolve espessamento da parede muscular, controle neural autonômico alterado, aumento da contratilidade e processo inflamatório agudo e crônico das vias aéreas, que pode causar dano epitelial. Além disso, considera-se que o aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular seja uma hipótese favorável para esclarecer a excessiva produção de força pelas células musculares lisas (LAW *et al.*, 2000; BAI; ZHANG; SANDERSON, 2007; PEREZ-ZOGHBI *et al.*, 2009).

Embora a contração das células do músculo liso das vias aéreas seja um fator crucial para a HRB, via final comum que conduz ao excessivo estreitamento das vias aéreas, outros componentes, tais como as alterações inflamatórias com infiltrados celulares, alterações estruturais como aumento ou diminuição da elastina e do colágeno, bem como proteoglicanos, podem modificar as respostas e contribuir para a HRB. Em conjunto, essas alterações são geralmente referidas ao remodelamento do tecido que tem sido caracterizado principalmente como sendo uma consequência anatômica provocada por mudanças na composição, quantidade e organização dos constituintes celulares e moleculares da parede das vias aéreas (AN *et al.*, 2007). Algumas análises histopatológicas de biópsias brônquicas reiteram o processo explanado acima, visto que demonstram a associação da infiltração de células inflamatórias com a remodelação das vias respiratórias (BERGER *et al.*, 2003).

Como já sinalizado anteriormente, a inflamação brônquica consiste em papel central na fisiopatogênese de diversas doenças do sistema respiratório, incluindo a asma (KUMAR, 2001). É sabido também que a inflamação crônica, que pode seguir um quadro agudo ou apresentar-se de maneira crônica insidiosa, leva ao aparecimento de alterações de caráter anatômico que tem por consequência o dano tecidual progressivo (MAUAD, 2000). É caracterizada por ser uma resultante das interações complexas que ocorrem entre os mediadores liberados por células inflamatórias. Diversos componentes participam desse processo inflamatório na asma, entre eles, podemos destacar as células circulantes:

neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos, assim como as células do tecido conjuntivo, destacando mastócitos e fibroblastos e por fim, componentes da matriz extracelular como proteínas fibrosas estruturais (colágeno e elastina), glicoproteínas de adesão e proteoglicanos (KUMAR, 2001; BARNES; CHUNG; PAGE, 1998; MAUAD, 2000).

A resposta asmática apresenta duas fases, a inicial e a tardia. Tão logo o paciente asmático entre em contato com o antígeno, ocorre a resposta alérgica inicial com a ligação do alérgeno aos receptores de IgE em células como mastócitos e basófilos, e a consequente liberação de mediadores que causam inflamação, vasodilatação e broncoconstrição. Citocinas e quimiocinas liberadas nesse período recrutam mais células inflamatórias para o local, levando a resposta alérgica tardia, 3 a 4 horas após a exposição. Portanto, no processo asmático, a maquinaria contrátil muscular encontra-se rodeada de mediadores inflamatórios, que parecem ser responsáveis pelo aumento na velocidade de contração e na diminuição da plasticidade muscular (BHARADWAJ; AGRAWAL, 2004). Dessa maneira, o mau funcionamento das vias aéreas pode ser um dos primeiros mecanismos pelo qual a inflamação induz a hiperresponsividade que, somada ao remodelamento, causa um comprometimento ainda maior da função muscular das vias aéreas no paciente asmático (FERNANDES *et al.*, 2003).

A agressão repetida ou intensa ao epitélio da via aérea associada à inflamação parece ser o evento inicial desencadeante do processo anormal de reparo na asma e tem como consequência o espessamento da mucosa, hiperplasia das glândulas submucosas, fibrose subepitelial, deposição de colágeno e aumento da massa muscular (BHARADWAJ; AGRAWAL, 2004; MAUAD, 2000).

Em cobaias, exposições repetidas ao alérgeno têm causado HRB e infiltração tecidual de leucócitos com característica histológica e farmacológica da asma em humanos (MASINI *et al.*, 2004). Em modelo experimental de asma alérgica, cobaias sensibilizadas com ovalbumina têm demonstrado o desenvolvimento de hiperresponsividade após o desafio antigênico e infiltração de eosinófilos nas vias aéreas (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 1993; PRETOLANI *et al.*, 1994). Ratos wistar ativamente sensibilizados e repetidamente desafiados com antígenos também apresentaram hiperresponsividade brônquica à acetilcolina (CHIBA, MISAWA, 1993).

Muito dos estímulos que exacerbam o processo asmático, incluindo infecções virais e poluentes podem ativar a produção de oxidantes, e esse acentuado estresse oxidativo também pode resultar na típica inflamação crônica das vias aéreas, uma vez que as células inflamatórias possuem a capacidade excepcional de produzir essas substâncias. No foco

inflamatório, as células inflamatórias e também as células do epitélio bronquial produzem oxidantes que promovem modificações no metabolismo celular, incluindo alteração no transporte iônico, alteração na permeabilidade da membrana, destruição celular por peroxidação lipídica, aumento da concentração intracelular de cálcio, liberação de histamina pelos mastócitos, além de secreção de muco substâncias (CARAMORI; PAPI, 2004; BARNES; CHUNG; PAGE, 1998).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Desde que bem estudada e compreendida, a biodiversidade brasileira representa importante fonte de riqueza e possui grande potencial para ser a fonte do desenvolvimento de novos medicamentos a base de produtos vegetais (GOTTLIEB *et al.*, 1998). Embora algumas espécies vegetais sejam registradas como tendo amplo uso na medicina popular, faltam ainda informações científicas suficientes para garantir sua eficácia e segurança terapêuticas. Dentre elas, podemos destacar *Hymenaea courbaril* L., largamente usada na medicina popular para o tratamento de úlceras, distúrbios estomacais e doenças respiratórias como bronquites e asma (MARSALOLI; FILHO; CAMPELO, 1975).

Ensaios farmacológicos pré-clínicos conduzidos com terpenóides obtidos do extrato metanólico dos frutos de *H. courbaril* mostraram forte atividade anti-inflamatória e antioxidante através da inibição da enzima COX e da peroxidação lipídica, respectivamente (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram seu potencial larvicida sobre *Aedes aegypti*, antiviral e moluscicida, bem como sua baixa toxicidade (KEIJI *et al.*, 1999; ABDEL-KADER *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2012; CECÍLIO *et al.*, 2012).

Diante do exposto e considerando que o uso de *Hymenaea courbaril* L. pela população, retratado através de estudos etnofarmacológicos, está relacionado a doenças inflamatórias do sistema respiratório tais como a asma, é de fundamental importância que sejam realizados estudos em modelos experimentais que avaliem o seu potencial farmacológico e justifiquem o seu uso tradicional (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; VIEIRA, 2011). Nesse sentido, esse trabalho foi desenhado para a realização de um estudo interdisciplinar bioquímico de *Hymenaea courbaril*, visando avaliar o seu efeito mio-relaxante e antiespasmódico sobre a musculatura lisa traqueal de ratos, os seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante, bem como realizar o isolamento e caracterização de substâncias presentes no extrato e/ou frações que se mostraram bioativas. A caracterização desses possíveis marcadores e a investigação dos seus efeitos farmacológicos inserem-se como fatores importantes na compreensão da ação de *H. courbaril* no sistema respiratório.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar estudo farmacológico bioguiado pela atividade miorelaxante do extrato etanólico das cascas do caule de *Hymenaea courbaril* L.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica da casca do caule de *Hymenaea courbaril* L.;
- Realizar a preparação e o fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de *H. courbaril*;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato etanólico da casca do caule de *H. courbaril* e frações;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico da casca do caule de *H. courbaril*, frações e constituinte químico isolado sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com a fração bioativa na resposta contrátil de traqueias isoladas de ratos desafiados à ovalbumina;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com a fração bioativa na resposta migratória de células inflamatórias em ratos desafiados à ovalbumina.
- Isolar e caracterizar constituintes químicos da fração bioativa;

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 *Material vegetal*

A casca do caule de *Hymenaea courbaril* L. foi coletada em abril de 2011 na cidade do Crato-Ce. Uma exsicata da espécie (nº 49901) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

4.1.2 *Animais*

Para os ensaios biológicos foram utilizados ratos machos Wistar (200-300 g) procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC). Os animais permaneceram em gaiolas apropriadas, em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura 23 ± 2 °C e umidade $55 \pm 10\%$) com fornecimento *ad libitum* de ração e água.

4.1.3 *Drogas, reagentes e solventes*

Hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol, acetona, ácido sulfúrico, ácido acético glacial e vanilina foram adquiridos da VETEC (Brasil), diclorometano deuterado e metanol deuterado, da Tedia (Ohio, EUA), enquanto a violeta genciana é de procedência da Reagen (Brasil). O radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH), Trolox, ácido ascórbico, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, bicarbonato de sódio, hidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de sódio, glicose, acetilcolina (ACh), verapamil, carbacol (CCh), ácido etileno glicol O'-bis(2-aminoetil)-N, N, N', N' -tetracetico (EGTA), ovalbumina (OVA), hematoxilina, eosina e Triton X-100 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA) ou da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o pentobarbital sódico é de procedência da Syntec (Brasil).

4.1.3.1 Composição das soluções

- **Solução de vanilina:** vanilina (1 g) e álcool etílico (q.s.p. 100 mL).
- **Solução etanólica de ácido sulfúrico:** ácido sulfúrico (10 mL) e álcool etílico (q.s.p. 100 mL).
- **Solução de Krebs- Henseleit (mmol/L):** NaCl (118,0), KCl (4,7), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25,0), KH₂PO₄ (1,2) e glicose (10,0).
- **Solução de Tyrode (mmol/L):** NaCl (136,0), KCl (5,0), MgCl₂ (0,98), CaCl₂ (2,0), NaH₂PO₄ (0,36) NaHCO₃ (11,9) e glicose (5,5).
- **Solução de Turk:** Ácido acético glacial (20 mL), violeta genciana (2,0 mL) e água destilada (q.s.p. 100 mL).
- **Salina heparinizada:** Heparina (0,1 mL) e NaCl 0,9% (q.s.p. 100 mL).

4.1.4 Equipamentos

Balança analítica (A&D Company, Japão); placa aquecedora (Fanem, Brasil); estufa para esterilização e secagem (Olidef CZ, Brasil); evaporador rotatório e bomba de vácuo (Büchi, Suíça); sonicador (Unique, Brasil); pHmetro (Hanna Instruments, EUA); espectrômetro DRX-500 (Bruker, Alemanha); aparelho digital de ponto de fusão (microquímica equipamentos, Brasil); espectrofotômetro de absorção ultravioleta-visível (Beckam Coulter, Alemanha); transdutor de força isométrico (AD Instruments, Austrália), nebulizador ultrasônico (Respira Max® Inalador Ultrasônico, NS Indústria de aparelhos médicos, Brasil), Luz ultravioleta 254 e 366nm (Desaga Heidelberg, Alemanha).

4.1.5 Outros materiais

Gel de sílica 60 0,0063-0,200 mm (Vetec, Brasil), placas de sílica em suporte de alumínio (Merck, Alemanha), Sephadex LH 20 (Amersham Biosciences, Suécia), colunas cromatográficas de vidro, pulverizador com junta esmerilhada, vidrarias volumétricas de uso comum em laboratório, seringas e material cirúrgico.

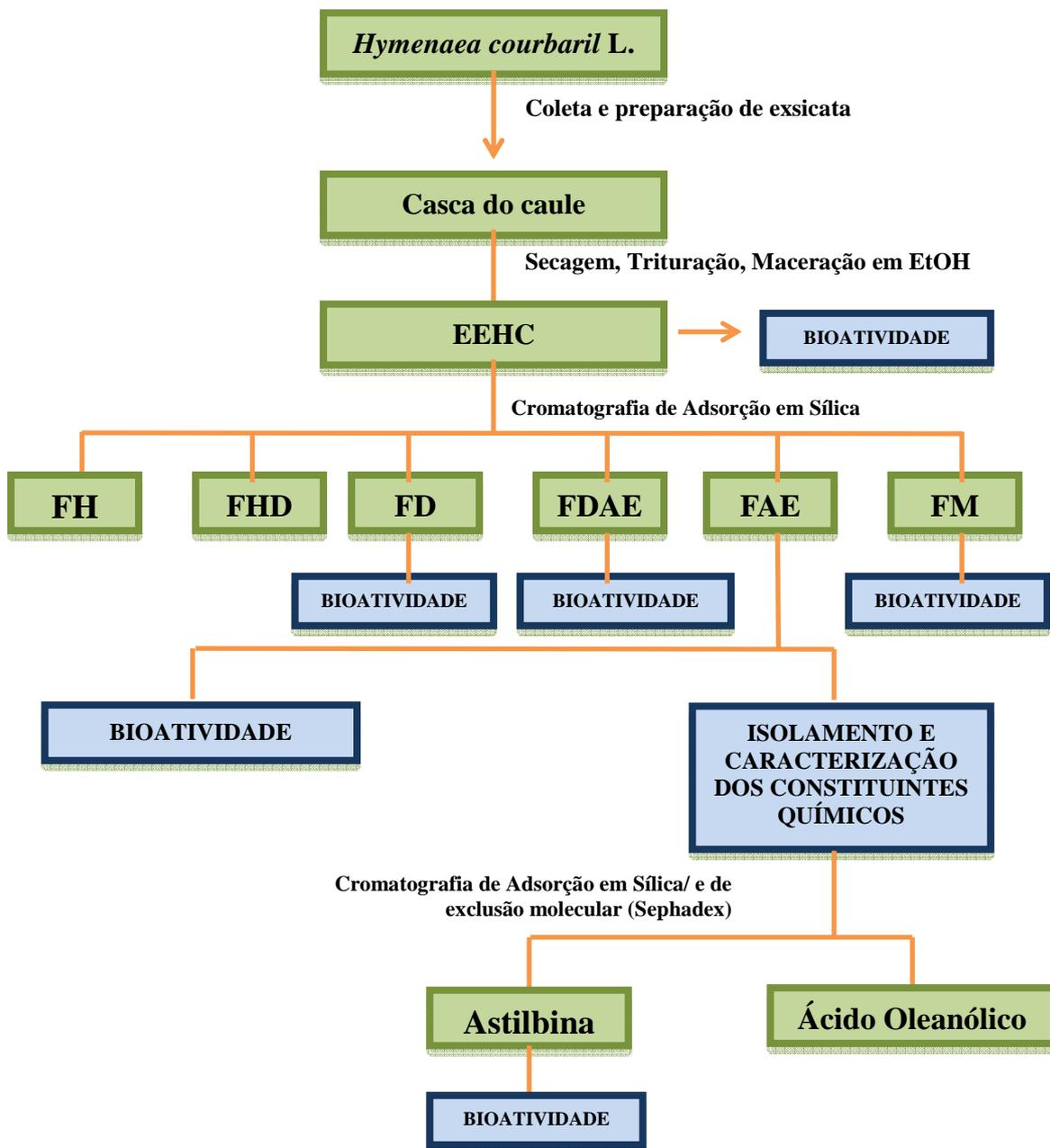
4.1.6 Aspectos éticos

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Parecer nº 37/12) da Universidade Federal do Ceará (Anexo).

4.2 Métodos

O presente estudo foi conduzido conforme o fluxograma a seguir (Figura 9).

Figura 9 - Fluxograma de metodologias desenvolvidas no estudo



4.2.1 Protocolos experimentais para caracterização química de *H. courbaril*

4.2.1.1 Prospecção química

A prospecção química para a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse foi realizada, utilizando-se os extratos aquoso, hidroalcoólico e diclorometânico a 10 % da droga vegetal (MATOS, 2009).

4.2.1.2 Obtenção do extrato etanólico da casca do caule e frações

A casca do caule de *H. courbaril* (509,9 g), após secagem e trituração, foi submetida à extração exaustiva por maceração à temperatura ambiente com etanol (13 x 1 L) e a solução etanólica obtida foi filtrada e, em seguida, concentrada por destilação sob pressão reduzida, resultando na obtenção de 86,1 g de extrato etanólico seco da casca de *H. courbaril* (EEHC).

O extrato etanólico da casca do caule de *H. courbaril* (EEHC) (80 g) foi submetido a um processo cromatográfico de adsorção em coluna filtrante de 43 cm de comprimento (L) e 4,5 cm de diâmetro (Φ), utilizando 660 g de gel de sílica. Foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias (1:1) como eluentes. O fracionamento cromatográfico resultou em seis frações, que foram concentradas por destilação sob pressão reduzida, resultando nas frações mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EEHC

FRAÇÕES	ELUENTE	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
FH	Hexano	0,075	0,094
FHD	Hexano:Diclorometano (1:1)	0,197	0,25
FD	Diclorometano	1,296	1,62
FDAE	Diclorometano:Acetato de Etila (1:1)	0,996	1,25
FAE	Acetato de Etila	1,926	2,41
FM	Metanol	61,340	76,68

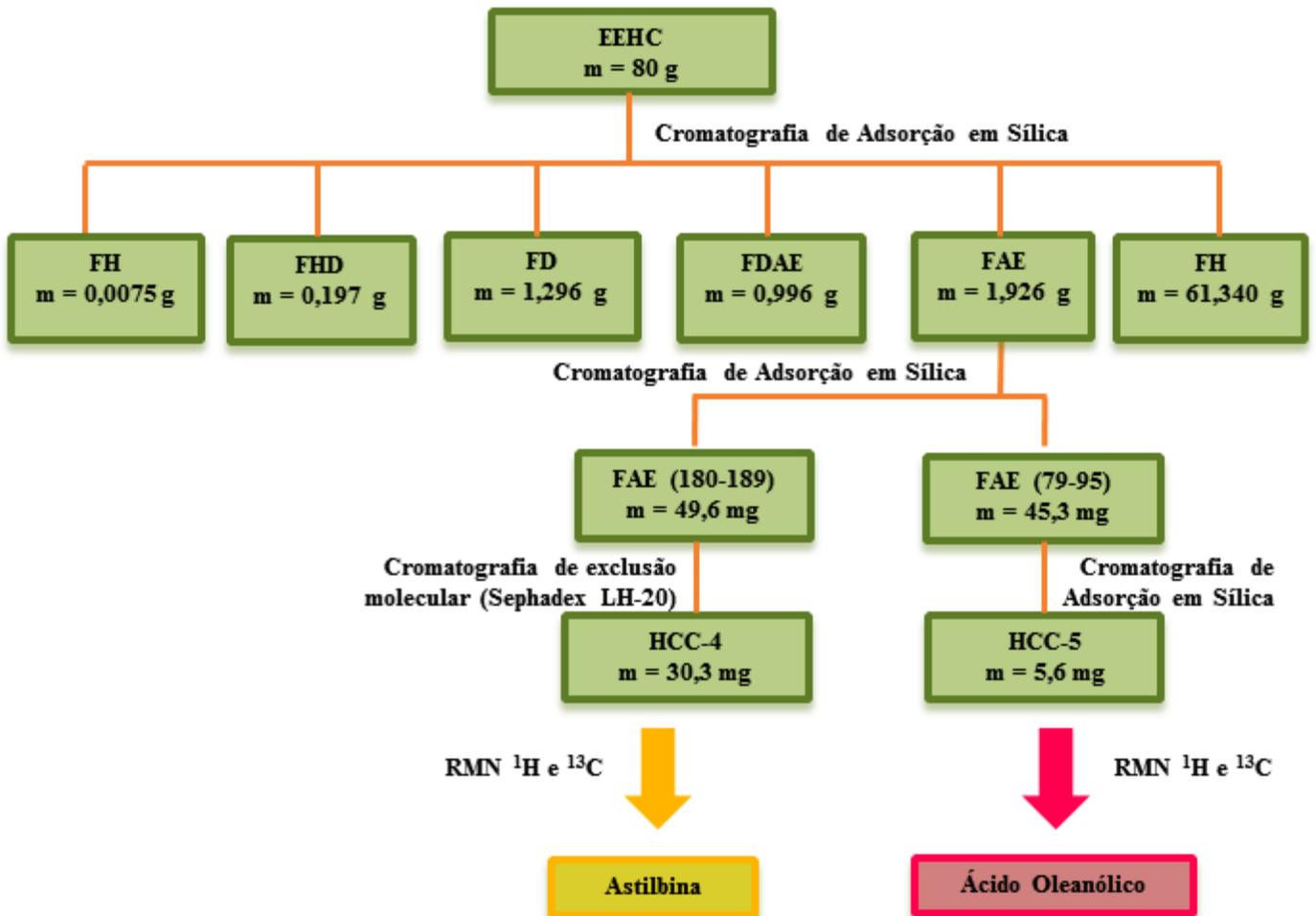
As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas se deu através da exposição à irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) e/ou por borrifação com solução de vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento.

4.2.1.3 Isolamento e caracterização de constituintes químicos

A prospecção dos constituintes químicos da planta foi realizada através de um estudo guiado pela avaliação do potencial miorelaxante do EEHC e das frações obtidas do seu fracionamento cromatográfico (FD, FDAE, FAE e FM). FH e FHD não foram submetidas aos ensaios biológicos devido ao baixo rendimento obtido no tratamento cromatográfico de EEHC.

A fração bioativa (FAE) foi, então, submetida a novos fracionamentos cromatográficos para o isolamento de seus constituintes químicos. Inicialmente, foi realizado o tratamento cromatográfico por adsorção em gel de sílica, seguido pelo refractionamento através de diversas técnicas cromatográficas, selecionando-se aquela adequada aos objetivos do trabalho e à natureza das subfrações obtidas. O tratamento cromatográfico de FAE e de suas subfrações foi desenvolvido de acordo com a Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma de fracionamento do EEHC, obtenção de frações e isolamento de constituintes químicos



A fração acetato de etila (FAE) (1,500 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna ($L = 22$ cm e $\Phi = 3$ cm) usando gel de sílica como adsorvente. Foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas de polaridades crescentes, como eluentes conforme mostrado na Tabela 2. As frações tiveram seus solventes evaporados e, em seguida, foram analisadas por CCD. Aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, resultando nas subfrações apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FAE

Frações	Eluente	Frações	Eluente	Frações	Eluente
1-15	Hex	102-115	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 30%	169-175	AcOEt:MeOH 30%
16-21	Hex:CH ₂ Cl ₂ 10%	116-120	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 35%	176-180	AcOEt:MeOH 40%
22-27	Hex:CH ₂ Cl ₂ 30%	121-128	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 40%	181-189	AcOEt:MeOH 50%
28-43	Hex:CH ₂ Cl ₂ 50%	129-136	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 60%	180-189	AcOEt:MeOH 60%
44-50	Hex:CH ₂ Cl ₂ 80%	137-141	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 80%	199-205	AcOEt:MeOH 70%
51-57	CH ₂ Cl ₂	142-148	AcOEt	206-212	AcOEt:MeOH 80%
58-88	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 10%	149-161	AcOEt:MeOH 10%	213-219	AcOEt:MeOH 90%
89-101	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 20%	162-168	AcOEt:MeOH 20%	214-230	MeOH

Hex: Hexano; CH₂Cl₂: Diclorometano; AcOEt: Acetato de etila; MeOH: Metanol

Tabela 3 - Dados referentes às subfrações obtidas do fracionamento cromatográfico da FAE

Frações	Massa(mg)	Frações	Massa (mg)	Frações	Massa	Frações	Massa (mg)
1-12	-	37-38	-	62-77	34,0	158	13,7
13-21	0,5	39-40	4,0	78	-	159-169	557,0
22	-	41	-	79-95	45,3	170-175	131,6
23-25	71,0	42-43	37,2	96-99	3,6	176-179	32,6
26-29	7,0	44-51	59,2	100-124	74,3	180-189	49,6
30-33	2,0	52	-	125-126	13,7	189-230	-
34	-	53-60	55,0	127-144	56,8		
35-36	20,1	61	-	145-157	23,4		

4.2.1.4 Fracionamento cromatográfico de FAE 180-189 e isolamento de HCC-4

A subfração denominada FAE 180-189 (49,6 mg) (Tabela 3) foi inicialmente solubilizada em acetona, resultando nas frações solúvel (37,3 mg) e insolúvel (12,3 mg). A fração solúvel foi, então, submetida ao tratamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH 20 (L = 15 cm e Φ = 1,5 cm), usando metanol como eluente. Foram obtidas 26 subfrações que

foram analisadas por CCD e, aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Dados referentes às subfrações obtidas do tratamento cromatográfico da fração solúvel em acetona de FAE 180-189

Frações	Massa (mg)
1-10	5,7
11-15	30,3
16-26	1,3

A subfração 11-15 (Tabela 4), que continha 30,3 mg, representando um rendimento correspondente a 1,57% de FAE, de um sólido marrom cristalino solúvel em metanol foi denominada de HCC-4.

4.2.1.5 Fracionamento cromatográfico de FAE 79-95 e isolamento de HCC-5

A subfração denominada FAE 79-95 (45,3 mg) (Tabela 3) foi submetida a uma cromatografia em coluna ($L = 16,5$ cm e $\Phi = 1,5$ cm), usando gel de sílica como adsorvente. Foram utilizados, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas de polaridades crescentes como eluentes conforme representado na Tabela 5. As frações tiveram seus solventes evaporados e, em seguida, foram analisadas por CCD. Aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, resultando nas subfrações apresentadas na Tabela 6.

Tabela 5 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FAE 79-95

Frações	Eluente	Frações	Eluente	Frações	Eluente
1-6	CH ₂ Cl ₂	80-86	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 40%	143-155	AcOEt:MeOH 30%
7-12	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 5%	87-93	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 50%	156-160	AcOEt:MeOH 40%
13-22	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 10%	94-100	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 60%	161-168	AcOEt:MeOH 50%
23-30	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 15%	101-107	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 80%	169-174	AcOEt:MeOH 60%
31-45	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 20%	108-114	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 90%	175-181	AcOEt:MeOH 70%
46-52	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 25%	115-120	AcOEt	182-187	AcOEt:MeOH 80%
53-64	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 30%	121-133	AcOEt:MeOH 10%	188-194	AcOEt:MeOH 90%
65-79	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 35%	134-142	AcOEt:MeOH 20%	195-201	MeOH

CH₂Cl₂: Diclorometano; AcOEt: Acetato de etila; MeOH: Metanol

Tabela 6 - Dados referentes às subfrações do fracionamento cromatográfico da FAE 79-95

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-11	-	35-41	3,3
12-14	2,4	42	-
15-17	9,6	43-75	10
18-20	-	76-120	-
21-25	6,6	121-122	5,3
26-30	-	123-135	6,7
31-33	1,9	136-201	-
34	-		

A subfração 21-25 (Tabela 6), que continha 6,6 mg, correspondente a 0,34% de FAE, de um sólido branco amorfo solúvel em diclorometano foi denominada de HCC-5.

As substâncias isoladas tiveram suas propriedades físicas determinadas e destas, foram obtidos os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono 13 (RMN ¹³C), com a finalidade de elucidar as suas estruturas.

Esses espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em aparelhos pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

(CENAUREMN) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

4.2.2 Protocolo experimental para avaliação do potencial antioxidante

4.2.2.1 Avaliação do potencial antioxidante do EEHC e frações através do teste do DPPH

Para a avaliação do potencial antioxidante do EEHC e suas frações foi utilizado o método de sequestro de radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH[•]) em comparação com o padrão positivo Trolox.

O DPPH possui coloração púrpura e pode ser detectado por espectrofotometria a 517 nm e quando é reduzido pela ação de um antioxidante transforma-se no composto difenil-picril-hidrazina, de cor amarela, promovendo a redução na sua detecção por absorvância. A porcentagem de atividade antioxidante corresponde, portanto, à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante e a quantidade deste agente necessária para decrescer 50% da concentração inicial de DPPH é denominada concentração inibitória (CI₅₀), ou seja, quanto maior o consumo do radical DPPH por uma amostra, menor será sua CI₅₀ e maior será sua atividade antioxidante (SOUZA, 2007).

O ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Brandy-Williams; Cuvelier; Berset (1995). EEHC, FD, FDAE, FAE e FM, nas concentrações que variaram de 0,001 a 1,0 mg/mL, foram dissolvidas em metanol e 1,0 mL de cada amostra foi adicionado a uma solução metanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60 µM. Foram realizadas, após 30 minutos, medidas de absorvância na faixa de 517 nm em espectrofotômetro de UV. A porcentagem de inibição foi obtida por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH e foi calculada de acordo com a equação mostrada a seguir.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{1 - \text{abs (Ad)}}{\text{abs (Ao)}} \right)$$

Onde: Ad = absorvância da solução de DPPH na presença da amostra teste e Ao = absorvância da solução controle de DPPH.

4.2.3 Protocolos experimentais para estudo do potencial miorrelaxante e antiespasmódico em tecido traqueal de ratos

4.2.3.1 Experimentos com anéis de traqueia

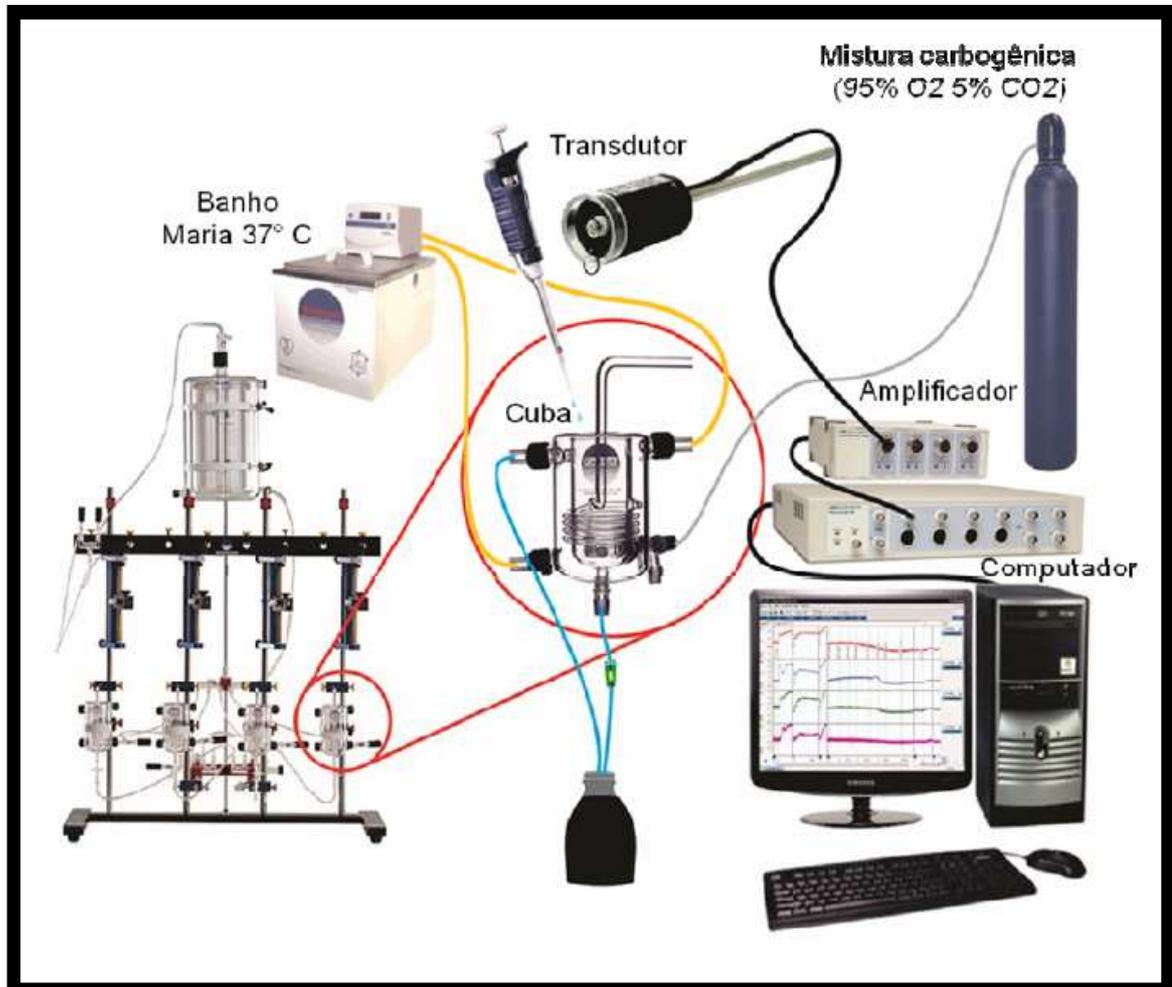
Os animais foram anestesiados com Pentobarbital (50 mg/Kg i.p) e, em seguida, a traqueia foi rapidamente removida e transportada para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit. Após a remoção do excesso de tecido adjacente, a traqueia foi cortada em segmentos cilíndricos de 3 a 4 anéis cartilagosos. Estes foram mantidos em um banho para órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit ou Tyrode em pH 7,4, a 37°C e aerada com mistura carbogênica. A luz dos anéis traqueais foi atravessada por duas peças metálicas de aço inoxidável, que foram atadas a dois pontos, um fixo na câmara de banho para órgãos e o outro, à unidade transdutora de força apropriada para registro de contrações isométricas. A tensão aplicada à traqueia foi ajustada em 1 g e mantida neste nível por um período de equilíbrio de 1 hora.

Para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de KCl até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude. Nesse momento, o tecido foi considerado em condições de iniciar qualquer outro procedimento.

As contrações e os relaxamentos foram registrados através desses transdutores de força que se encontravam conectados a um sistema de aquisição de dados (PowerLab ADI Austrália), conforme ilustrado nas Figura 11 e 12.

EEHC, frações e astilbina (HCC-4) foram dissolvidos em solução aquosa de Tween 80 2%, e a sua concentração na câmara de banho para órgãos final não excedeu 0,6%.

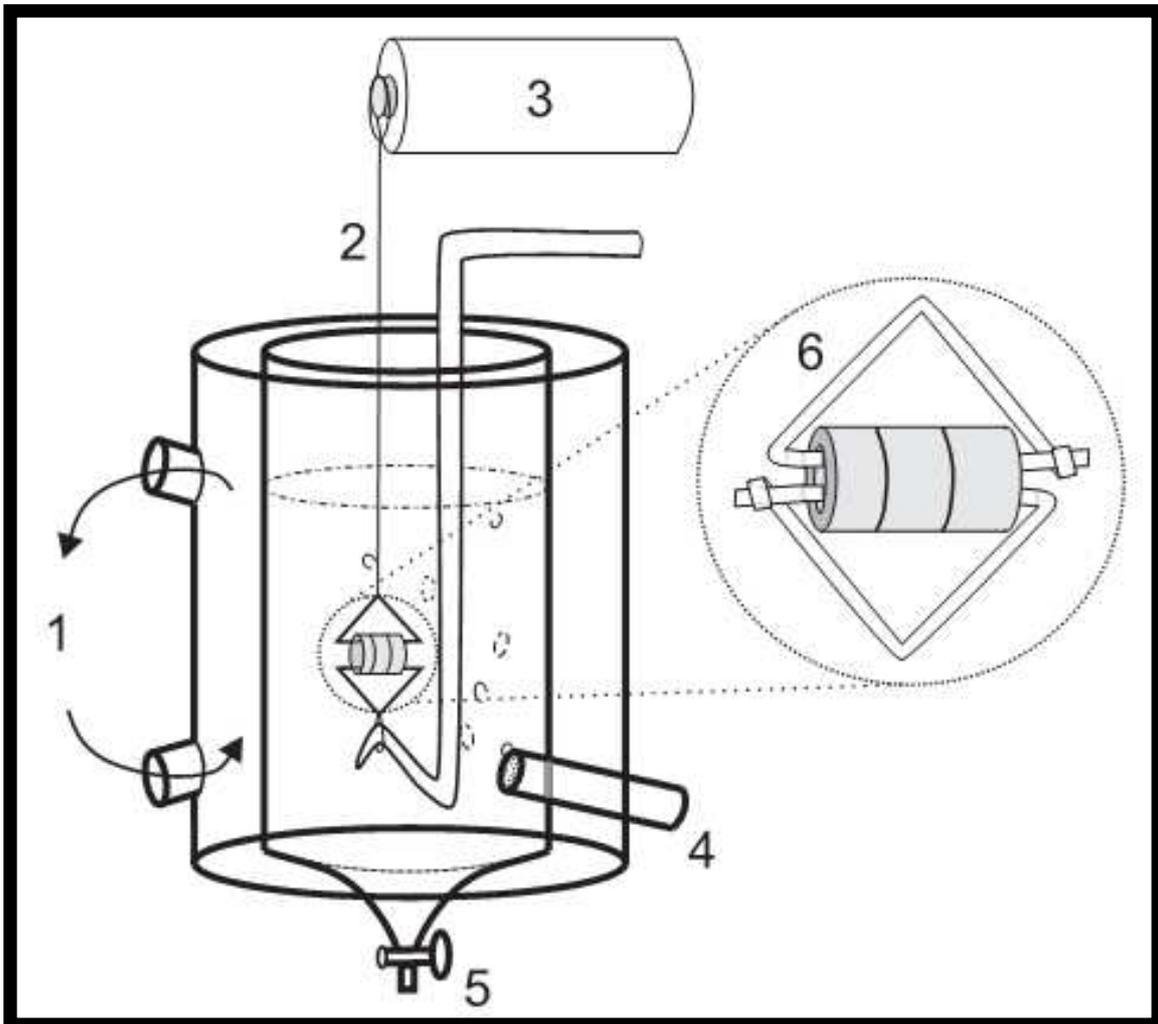
Figura 11 - Sistema utilizado nos ensaios de contratilidade *in vitro* em traqueia de rato



Após a preparação dos tecidos, estes eram montados em câmaras de vidro de capacidade para 5 mL de solução fisiológica, aerada com mistura carbogênica e com temperatura constante de 37 °C, mantida através da circulação de água proveniente do banho-maria com propulsão. Uma das extremidades do tecido era fixada a um transdutor de força, conectado a um amplificador e este a um sistema de aquisição de dados para registro das alterações contráteis.

Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI)

Figura 12 - Detalhe da montagem de anéis de traqueia de rato no sistema de avaliação da contratilidade tecidual *in vitro*



Uma das extremidades do tecido era atada a uma haste fixa e a outra extremidade a um transdutor de força. Onde 1: Circulação de água destilada à 37 °C, 2: Fio de algodão, 3: Transdutor de força, 4: Aeração com mistura carbogênica, 5: Descarte, 6: Anéis de traqueia presos em peças triangulares de aço.

Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI), cedido por Batista-Lima.

4.2.3.2 Avaliação do efeito da adição in vitro de EEHC, frações e astilbina sobre CCE induzida por CCh ou KCl

Anéis de traqueia com epitélio íntegro foram montados em câmaras para órgãos contendo solução fisiológica de Krebs-Henseleit, isolados conforme descrição anterior (item 4.2.3.1). Após o período de equilíbrio, o tecido foi pré-contráido com Carbacol (CCh – 1 μ M) ou KCl (60 mM) e logo após a contração sustentada tornar-se estável, foram confeccionadas curvas concentração-efeito (CCE) através da adição cumulativa de várias concentrações (1-1000 μ g/mL) de EEHC, suas frações (FD, FDAE, FAE e FM) ou ainda de astilbina (HCC-4), de maneira que as amostras adicionadas a uma dada concentração na câmara foram assim mantidas por um período de cinco minutos até que a próxima concentração fosse adicionada de forma subsequente.

O relaxamento foi expresso como percentual da magnitude da contração induzida por CCh ou KCl e o valor de relaxamento máximo para a curva concentração-efeito foi considerado alcançado quando o aumento na concentração de dada substância não induziu resposta contrátil adicional àquela observada com a concentração anterior ou no limite da maior concentração usada no estudo. Após a adição da maior concentração, o tecido foi lavado mediante troca da solução contendo o agente contrátil e as substâncias teste (extrato, frações ou astilbina) por solução fisiológica de Krebs-Henseleit na câmara de banho e, em seguida, adicionou-se K^+ 60 mM. Esse procedimento foi realizado três vezes com intervalo de dez minutos entre um e outro. A comparação da amplitude na contração induzida por esse agente ao final do experimento com a amplitude obtida inicialmente permitiu avaliar a capacidade de recuperação do tecido após a adição do extrato e/ou frações.

4.2.3.3 Avaliação do efeito da adição in vitro de FAE na CCE induzida por Ca^{2+} em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca^{2+} e na presença de acetilcolina

Anéis de traqueia foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme a descrição do item anterior (item 4.2.3.1). O protocolo foi iniciado com duas contrações de KCl 60 mM na presença de solução fisiológica de Tyrode normal. Posteriormente, a solução da câmara foi trocada exaustivamente por solução fisiológica preparada sem Ca^{2+} e a ela foi adicionada EGTA, agente quelante de Ca^{2+} (1 mM) e verapamil, bloqueador de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L (10 μ M), retirando a influência desses canais. Após um período de cinco minutos, adicionou-se ACh (10 μ M) e uma contração não sustentada foi registrada. Após o retorno do traçado ao valor basal, foi confeccionada uma CCE pela adição

cumulativa de Ca^{2+} (0,1 – 50 mM), com intervalo de quatro minutos entre a adição de uma concentração e outra.

Ao final da confecção da CCE, o tecido foi lavado diversas vezes com solução fisiológica de Tyrode normal e o protocolo foi reiniciado com uma contração induzida por KCl 60 mM. Posteriormente, a solução da câmara foi trocada por solução fisiológica preparada sem Ca^{2+} e a ela, como já descrito anteriormente, foi adicionada EGTA (1 mM) e verapamil (10 μM). Em seguida, adicionou-se ACh (10 μM) e uma pequena contração não sustentada foi registrada. Após o retorno do traçado ao valor basal, adicionou-se FAE nas concentrações de 300 $\mu\text{g/mL}$ ou 600 $\mu\text{g/mL}$ e passados cinco minutos, outra CCE pela adição cumulativa de Ca^{2+} foi confeccionada, mantendo-se as mesmas condições experimentais anteriormente descritas.

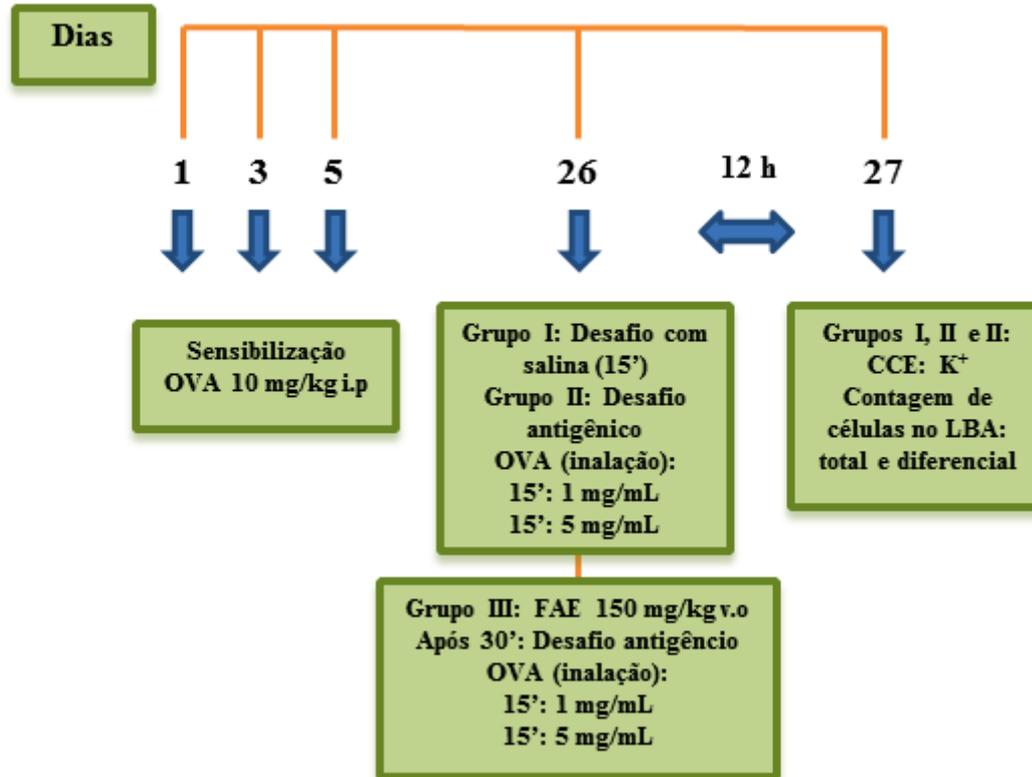
4.2.3.4 Avaliação do efeito da adição in vitro de FAE na CCE induzida por Ba^{2+} em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca^{2+} e na presença de acetilcolina

Anéis de traqueia foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme a descrição do item anterior (item 4.2.3.1). O protocolo foi iniciado com duas contrações de KCl 60 mM na presença de solução fisiológica de Tyrode normal. Posteriormente, a solução da câmara foi trocada exaustivamente por solução fisiológica preparada sem Ca^{2+} e a ela foi adicionada EGTA (1 mM). Após um período de cinco minutos, adicionou-se ACh (10 μM) e uma contração não sustentada foi registrada. Após o retorno do traçado ao valor basal, foram confeccionadas curvas concentração-efeito pela adição cumulativa de Ba^{2+} (0,1 – 50 mM), com intervalo de quatro minutos entre a adição de uma concentração e outra na presença ou na ausência de FAE nas concentrações de 300 $\mu\text{g/mL}$ ou 600 $\mu\text{g/mL}$ ou verapamil (10 μM), que foi utilizado, neste protocolo, como controle positivo.

4.2.3.5 Avaliação do efeito de FAE em traqueia de ratos desafiados com antígeno

O protocolo (Figura 13) a seguir foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de FAE em modelos experimentais que mimetizam o processo asmático, principalmente no que diz respeito à hiperreatividade das vias aéreas, geralmente mediada por processo inflamatório.

Figura 13 - Representação esquemática do protocolo utilizado para avaliação do efeito de FAE em modelo experimental que mimetiza o processo asmático



4.2.3.5.1 Sensibilização e bronco-provocação antigênica de ratos

Os animais foram sensibilizados ativamente por meio de injeções intraperitoneais de ovoalbumina (OVA - 10 mg/kg, 3 aplicações nos dias 1, 3 e 5). Os animais sensibilizados foram submetidos, após o período de sensibilização, ao desafio antigênico por inalação, que ocorreu entre os dias 21 e 50 pós-sensibilização e 12 horas antes dos experimentos *in vitro*. Para tal, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico com as medidas de 30 x 16,6 x 19,8 cm. Na parte superior da caixa existe uma tampa removível para introdução dos animais. Nas porções laterais existem dois orifícios, sendo um para acoplar o nebulizador ultrassônico e o outro para servir de escape, evitando a reinalação do ar expirado.

A ovoalbumina inalada foi diluída em solução salina e o período de duração da inalação foi de 30 minutos ou até que, eventualmente, ocorresse desconforto respiratório (aparecimento de tiragem intercostal ou tosse associada à coriza intensa). Aconteceram duas sessões sequenciais de inalação de 15 minutos. As concentrações de ovoalbumina utilizadas nas duas sessões foram 1 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente.

4.2.3.5.2 Efeito da administração oral de FAE na curva concentração-efeito induzida por KCl

Em um grupo de animais sensibilizados ao antígeno foi administrada uma solução de FAE com a dose única de 150 mg/kg por via oral. Em seguida, decorridos 30 minutos, os animais foram desafiados mediante nebulização de solução salina ou solução salina contendo o antígeno sensibilizante. Após 12 h, os animais sensibilizados e desafiados com salina (Grupo I), desafiados com antígeno (Grupo II) e desafiados com antígeno pré-tratados com FAE (Grupo III) foram sacrificados e os anéis de traqueia foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme o item 4.2.3.1 para a confecção das curvas concentração-efeito pela adição cumulativa de KCl (10 a 140 mM).

4.2.4 Protocolo experimental para avaliação preliminar do potencial anti-inflamatório

4.2.4.1 Avaliação do efeito de FAE sobre o acúmulo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos desafiados com antígeno

Para avaliação do efeito de FAE (150 mg/kg) no conteúdo do LBA de ratos desafiados à ovalbumina, os animais do grupo I, II e III foram anestesiados com Pentobarbital. Após exposição cirúrgica e canulação da traqueia, os animais tiveram os pulmões preenchidos com 5 mL de salina a 37° C, injetada na cânula traqueal por meio de seringa, que foi mantida conectada à cânula traqueal pelo período de três minutos e, em seguida, o líquido injetado foi lentamente recuperado. O procedimento foi realizado duas vezes em cada animal e os fluidos recuperados foram acondicionados em tubos destinados à contagem de células.

A amostra do LBA foi, então, centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 200 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 2 mL de salina heparinizada (HUTSON *et al.*, 1988). As contagens total e diferencial das células das amostras dos grupos sensibilizados e desafiados obtidos de animais tratados ou não foram realizadas de acordo com o método descrito por Souza e Ferreira (1985). Para tanto, uma alíquota de 20 µL do material ressuscitado foi diluída em 380 µL de líquido de Turk para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Outra alíquota de 30 µL do ressuscitado foi utilizada para a contagem diferencial de células. Os esfregaços foram confeccionados e corados pelo método de hematoxilina-eosina. As células foram examinadas em microscópio óptico, utilizando uma objetiva com aumento de 100 vezes, onde foram contadas 100 células em cada lâmina. Foram diferenciadas quatro tipo de células: macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. O número de células foi estimado e avaliado em função da porcentagem total de leucócitos encontrada na contagem total.

4.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SigmaPlot 11.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre grupos foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA), teste de Mann-Whitney, Rank Sun, Holm-Sidak, e teste t de Student. A significância estatística foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados de contratilidade foram expressos como valores absolutos (g) ou como percentual (%) da resposta média da contração de referência induzida por K^+ , que foi obtida no início dos experimentos. Por outro lado, o número de células no lavado broncoalveolar foi expresso por volume.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudo químico de *Hymenaea courbaril* L.

5.1.1 Prospecção química

A abordagem fitoquímica da casca do caule de *Hymenaea courbaril* L. revelou a presença de polifenóis, principalmente flavonóides e taninos, bem como antociânicos, digitálicos, triterpenóides e saponinas, conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Perfil fitoquímico da casca do caule de *Hymenaea courbaril* L.

Classe Química	Tipo de Extrato	Método	Reação Positiva	Resultado
Saponínicos	Aquoso	Agitação vigorosa	Espuma estável por mais de 30 min.	+
Alcalóides	Aquoso acidificado	Dragendorff Bertrand Hager	Precipitado laranja avermelhado	- - -
Flavonóides	Hidroalcoólico	Ácido clorídrico R e fita de Magnésio	Coloração rósea ou vermelha	+
Antraquinônicos	Hidroalcoólico	Benzeno e solução aquosa de hidróxido de amônio 10%	Coloração rósea na fase amoniacal	-
Antociânicos	Hidroalcoólico	Alteração do Ph	Mudanças de coloração	+
Digitálicos	Hidroalcoólico	Ácido 3,5-dinitrobenzóico e hidróxido de potássio 2N	Coloração avermelhada	+
Taninos	Aquoso	Solução alcaloídica Solução de cloreto férrico Solução de dicromato de potássio	Mudança de coloração ou formação de precipitado	+ + +
Esteróides	Etéreo	Anidrido Acético e ácido sulfúrico	Coloração verde	+
Triterpenóides	Etéreo	Anidrido Acético e ácido sulfúrico	Coloração castanha	+
Cumarinas	Hidroalcoólico	CCD em sílica. Eluente: Hexano : Acetato de Etila : Metanol(6:13:1) Revelador: Hidróxido de potássio 5%	Fluorescência verde sob luz UV (365nm)	-

(+): presente; (-): ausente

5.1.2 Isolamento e caracterização de constituintes de FAE

Do tratamento cromatográfico de FAE já descrito no item 4.2.1.4 foi possível isolar e caracterizar dois metabólitos secundários, HCC-4 identificado como o flavonóide astilbina e HCC-5 identificado como o triterpeno ácido oleanólico.

5.1.2.1 Determinação estrutural de HCC-4

A substância denominada HCC-4 foi isolada sob a forma de um sólido marrom cristalino, solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 182 - 184 °C.

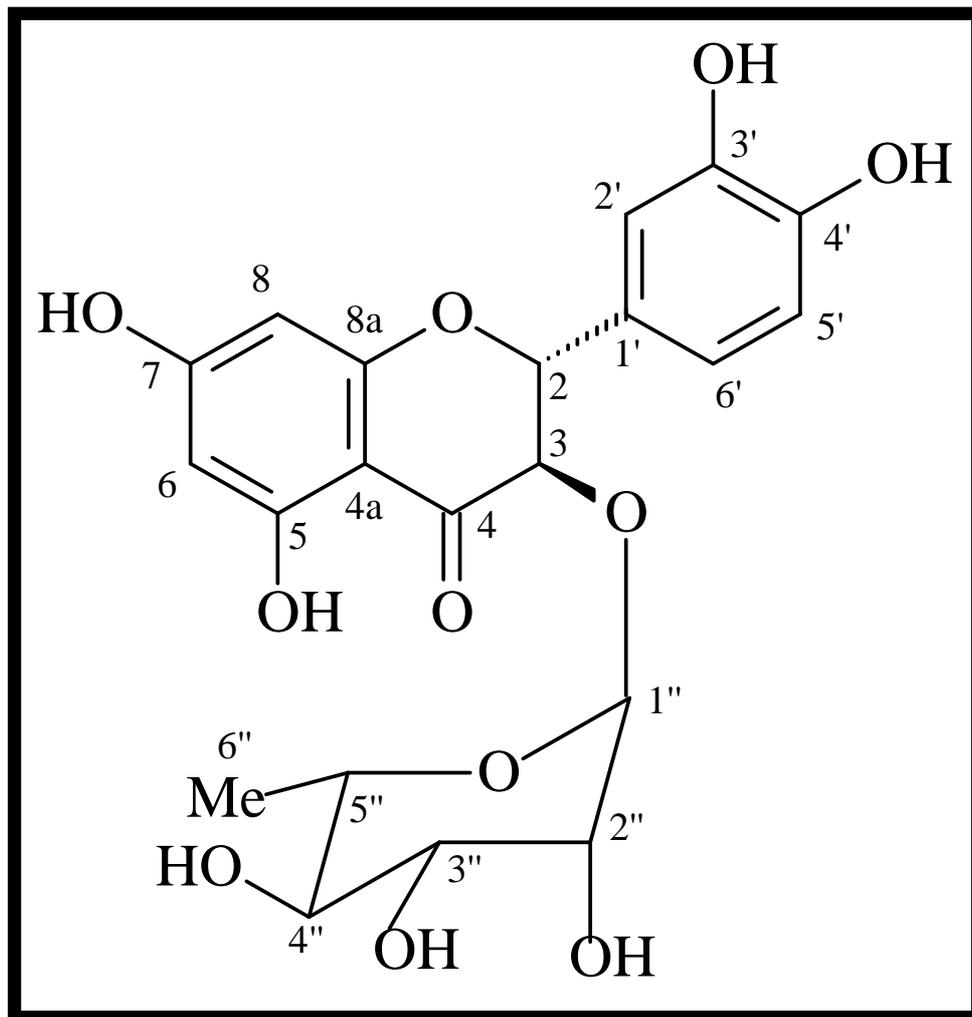
O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de HCC-4 (Figura 15, pág.69) mostrou cinco sinais na faixa entre δ 5,90 – 6,96, os quais foram associados a sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. Destes foram assinalados os dubletos centrados em δ 5,90 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) e δ 5,92 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) como relativos a hidrogênios em posição *meta*. O sinal referente a hidrogênio ligado a carbono aromático assinalado em δ 6,96 (1H, *d*, $J = 1,7$ Hz) refere-se, provavelmente, a hidrogênio *meta* posicionado. Este espectro mostrou ainda sinais na região entre δ 3,31-4,26 associados a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, provavelmente indicativos da existência de uma unidade de açúcar. O sinal em δ 4,06 (1H, $J = 1,7$ Hz) e o sinal em δ 1,14 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz) sugere a presença da ramnose, pois são compatíveis, com o deslocamento químico (δ) de hidrogênio ligado a carbono anomérico e de grupo metílico, respectivamente. Este espectro mostrou também sinais de absorção de hidrogênio relacionados a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ 4,57 (1H, *d*, $J = 10,7$ Hz) e δ 5,08 (1H, *d*, $J = 10,6$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, CD_3OD) de HCC-4 (Figura 17, pág. 70) mostrou 21 linhas espectrais e através da comparação deste com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 18, pág. 70) foi possível definir o padrão de hidrogenação relativo a cada átomo de carbono e distinguir aqueles não hidrogenados dos demais por subtração espectral. Esta análise permitiu identificar 1 carbono metílico (CH_3), 12 carbonos metínicos (CH), sendo 9 oxigenados (CH – O) e 8 carbonos não hidrogenados (C). A partir destes resultados foi possível propor fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ para HCC-4.

O resultado da análise dos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C , bem como dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC e HMBC e dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY e NOESY de HCC-4, mostrados nas Figuras 15 a 26 (pág. 69-74), e a comparação desses dados com dados descritos na

literatura (LUCAS-FILHO *et al.*, 2010), permitiram identificar HCC-4 como astilbina, cuja estrutura encontra-se mostrada na Figura 14. A Tabela 8 mostra a comparação dos dados espectroscópicos de HCC-4 com os da astilbina descritos na literatura (LUCAS-FILHO *et al.*, 2010).

Figura 14 - Estrutura química de HCC-4



Nome químico: (2*R*, 3*R*) 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3- α -*O*-ramnose

Tabela 8 - Dados espectroscópicos de HCC-4 comparados com aqueles descritos na literatura (LUCAS-FILHO *et al.*, 2010) para astilbina

	HSQC		HMBC		Literatura (CD ₃ OD + D ₂ O)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, mult., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, mult., <i>J</i> Hz)
C						
4	196,11		H-3	H-2	196,11	-
5	165,64		H-6		165,66	-
7	168,76		H-6, H-8		168,82	-
8 ^a	164,24		H-8	H-2	164,25	-
4 ^a	102,64			H-6, H-8	102,64	-
1'	129,33		H-2, H-6'	H-3	129,35	
3'	146,68		H-2	H-5'	146,69	-
4'	147,51		H-5'	H-2', H-6'	147,52	-
CH						
2	84,09	5,08, <i>d</i> , 10,6	H-3	H-2', H-6'	84,10	5,08, <i>d</i> , 10,7
3	78,72	4,57, <i>d</i> , 10,7	H-2	H-1''	78,72	4,58, <i>d</i> , 10,7
6	97,54	5,92, <i>d</i> , 2,2		H-8	97,55	5,92, <i>d</i> , 2,2
8	96,42	5,90, <i>d</i> , 2,1		H-6	96,43	5,90, <i>d</i> , 2,2
2'	115,65	6,96, <i>d</i> , 1,7		H-2	115,64	6,95, <i>d</i> , 1,9
5'	116,49	6,82, <i>sl</i>			116,48	6,81, <i>d</i> , 8,3
6'	120,63	6,83, <i>d</i> , 1,9		H-2	120,63	6,84, <i>dd</i> , 8,3, 1,9
1''	102,29	4,06, <i>d</i> , 1,7		H-3	102,29	4,06, <i>d</i> , 1,5
2''	71,92	3,54, <i>dd</i> , 3,2, 1,7			71,93	3,54, <i>dd</i> , 3,3, 1,5
3''	72,32	3,66, <i>dd</i> , 9,8, 3,6			72,33	3,67, <i>dd</i> , 9,6, 3,3
4''	73,96	3,31, <i>m</i>			73,97	3,31, <i>m</i>
5''	70,66	4,26, <i>m</i>		H-1'', H-6''	70,66	4,25, <i>m</i>
CH₃						
6''	17,99	1,14, <i>d</i> , 6,2			17,99	1,18, <i>d</i> , 6,2

Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) de HCC-4

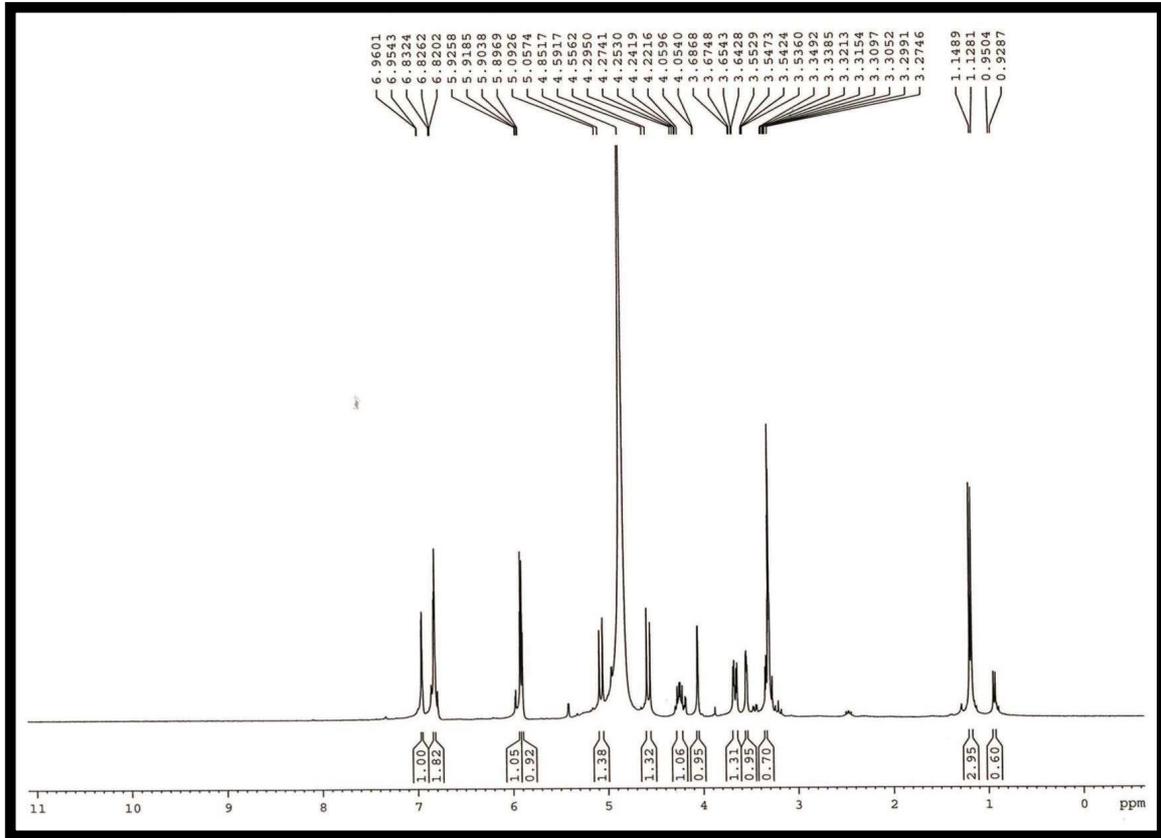


Figura 16 - Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) de HCC-4

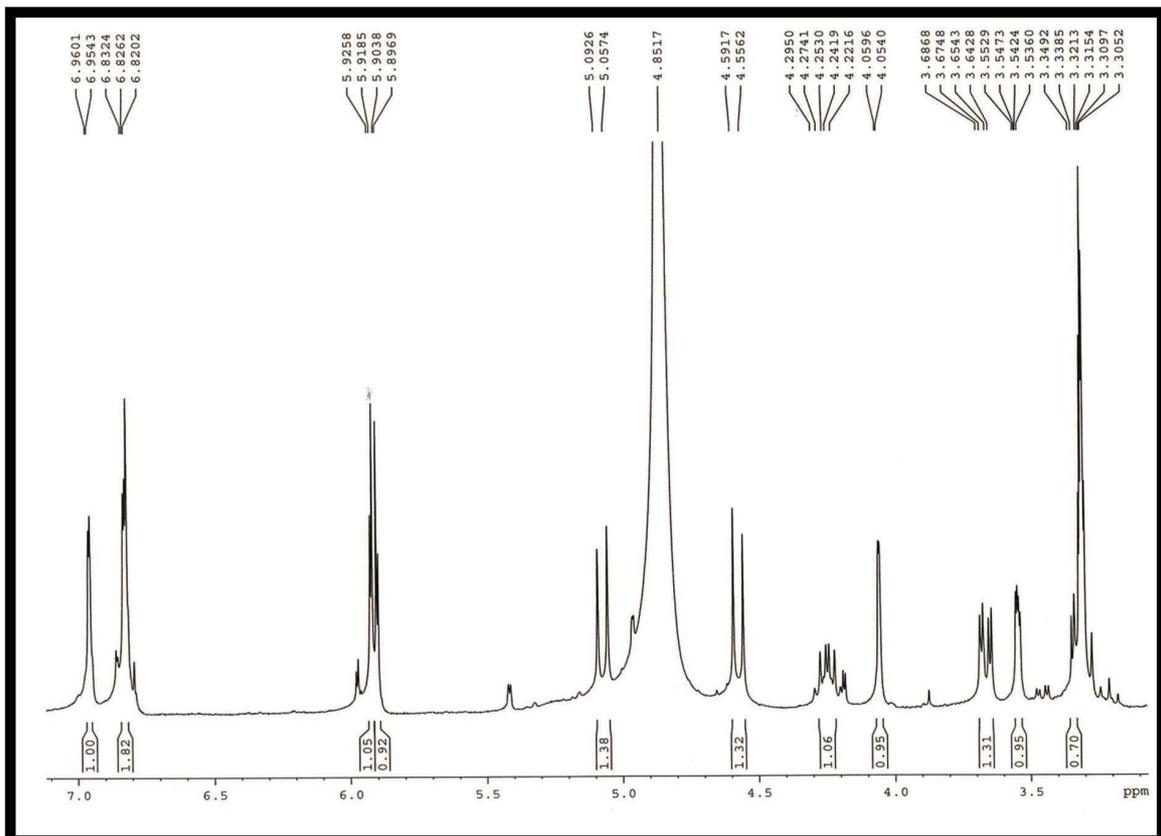


Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) de HCC-4

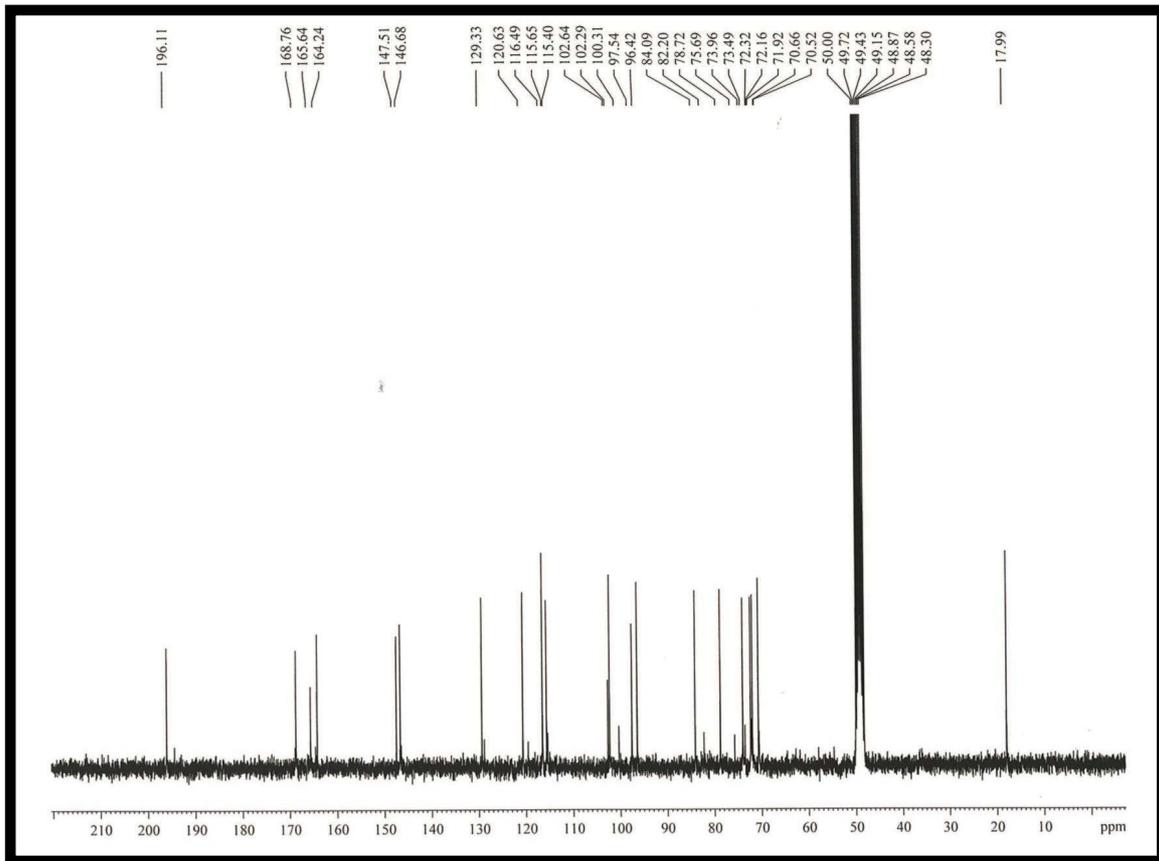


Figura 18 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz; CD_3OD) de HCC-4

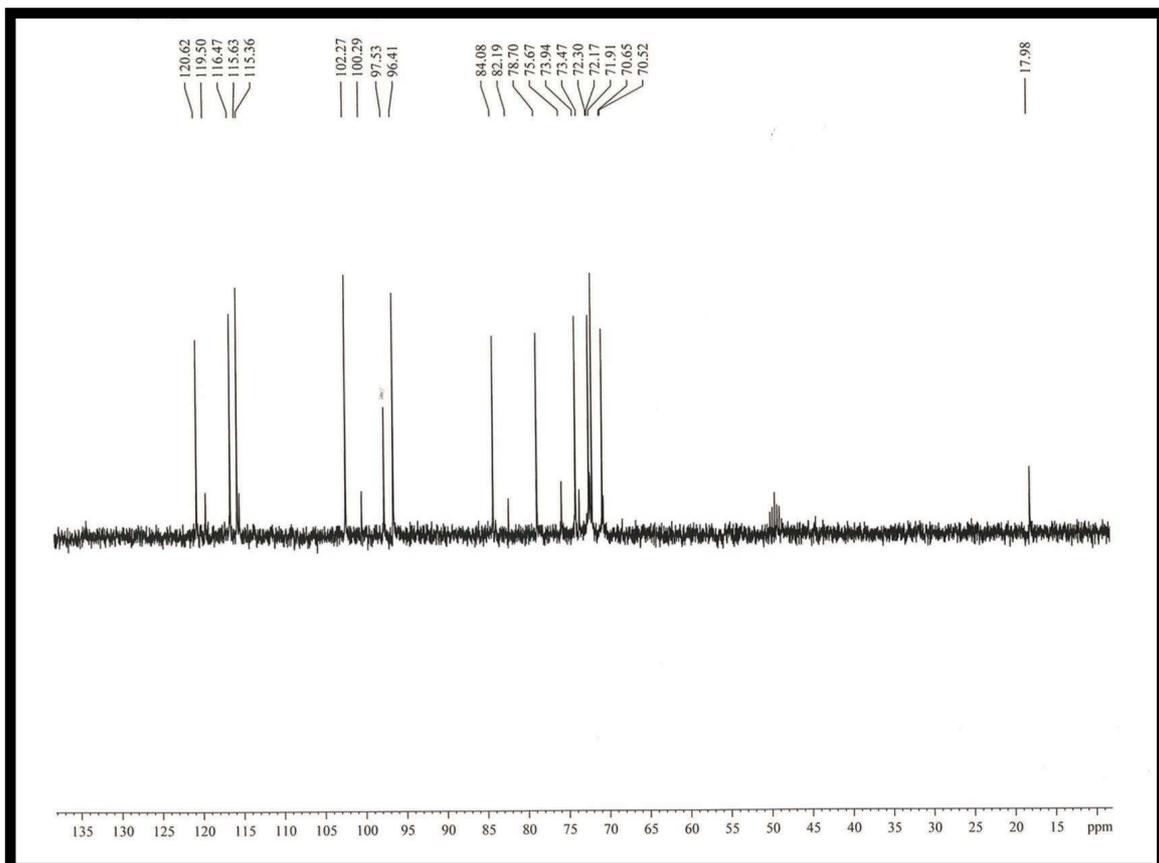


Figura 19 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-4

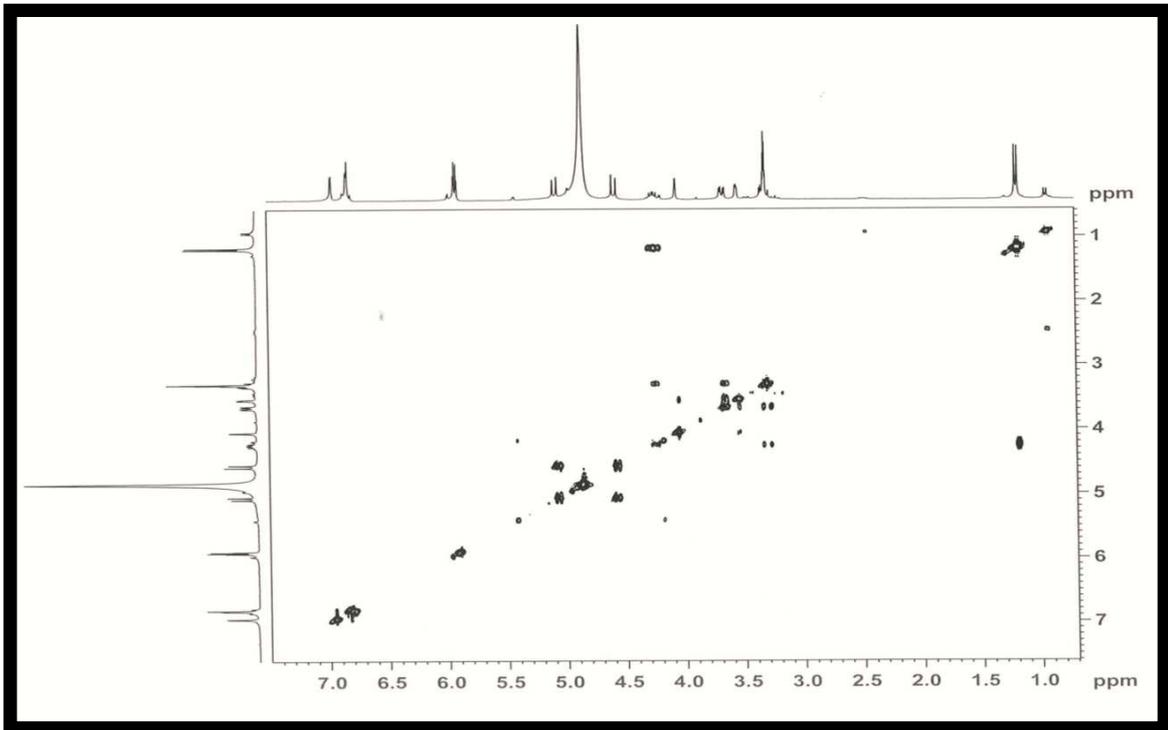


Figura 20 - Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-4

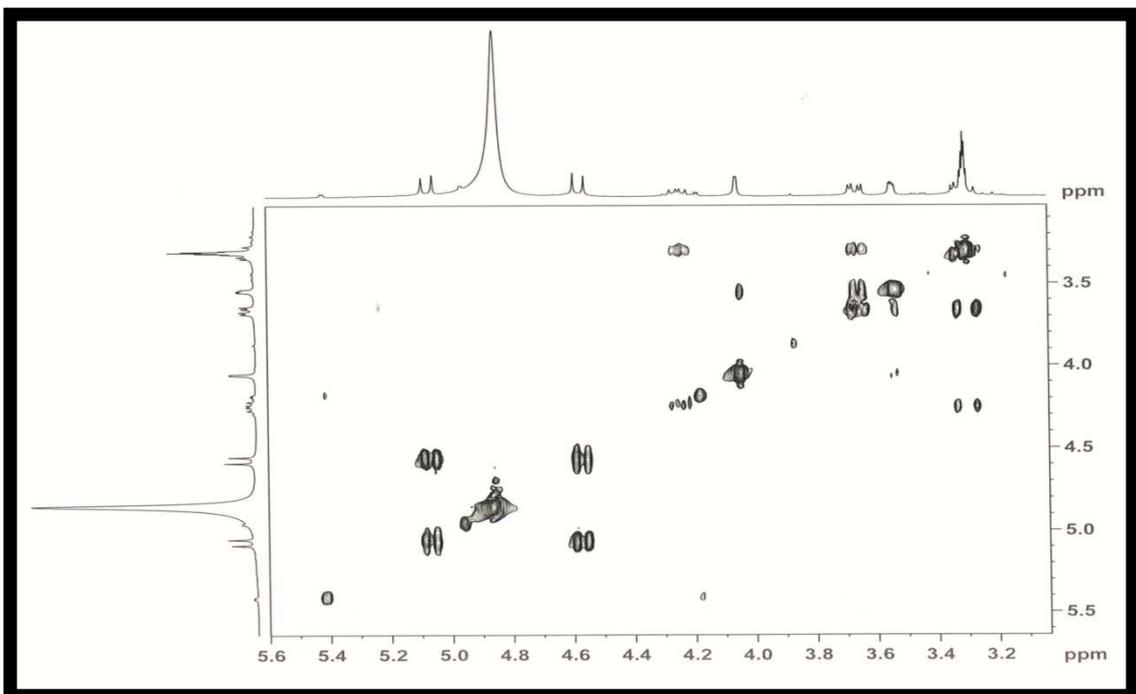


Figura 21 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC-4

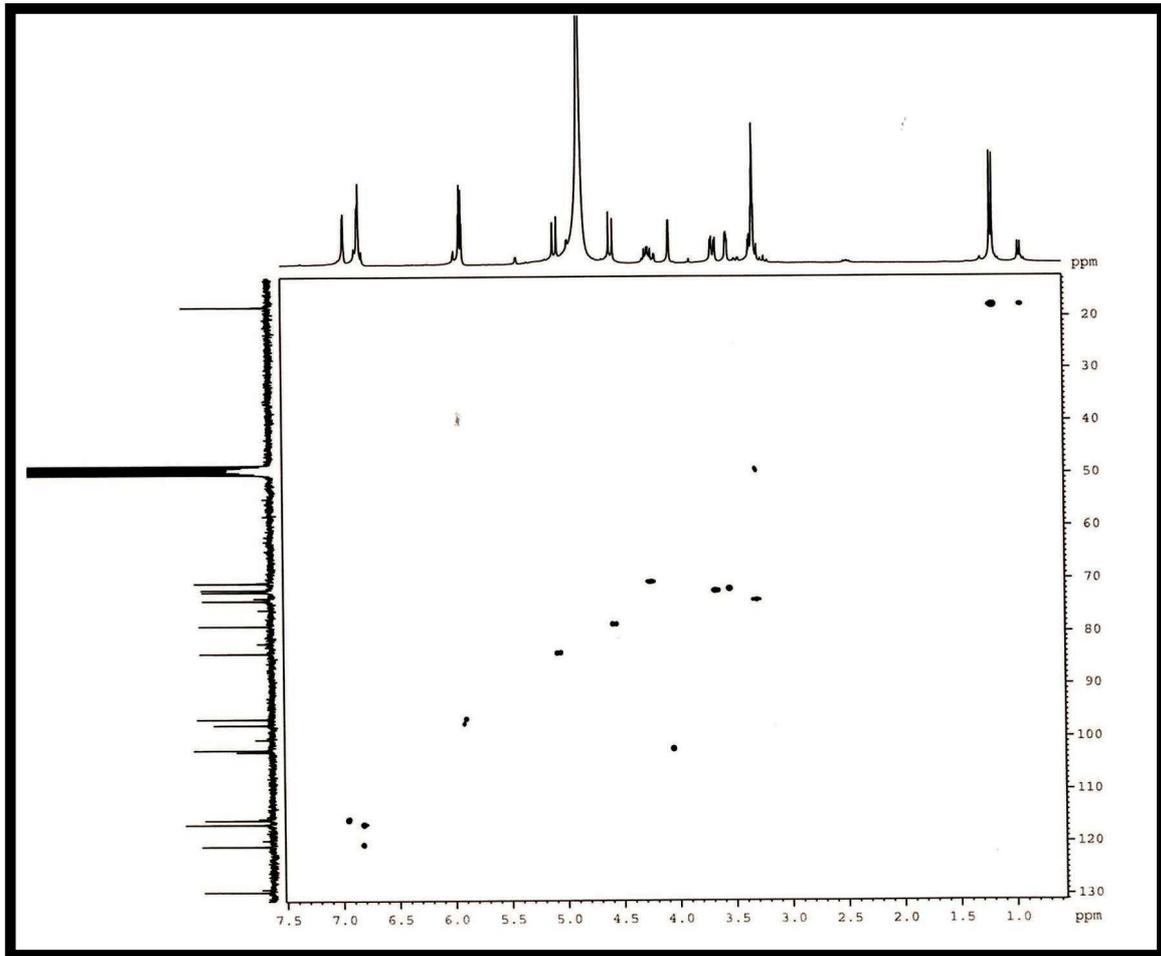


Figura 22 - Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC4

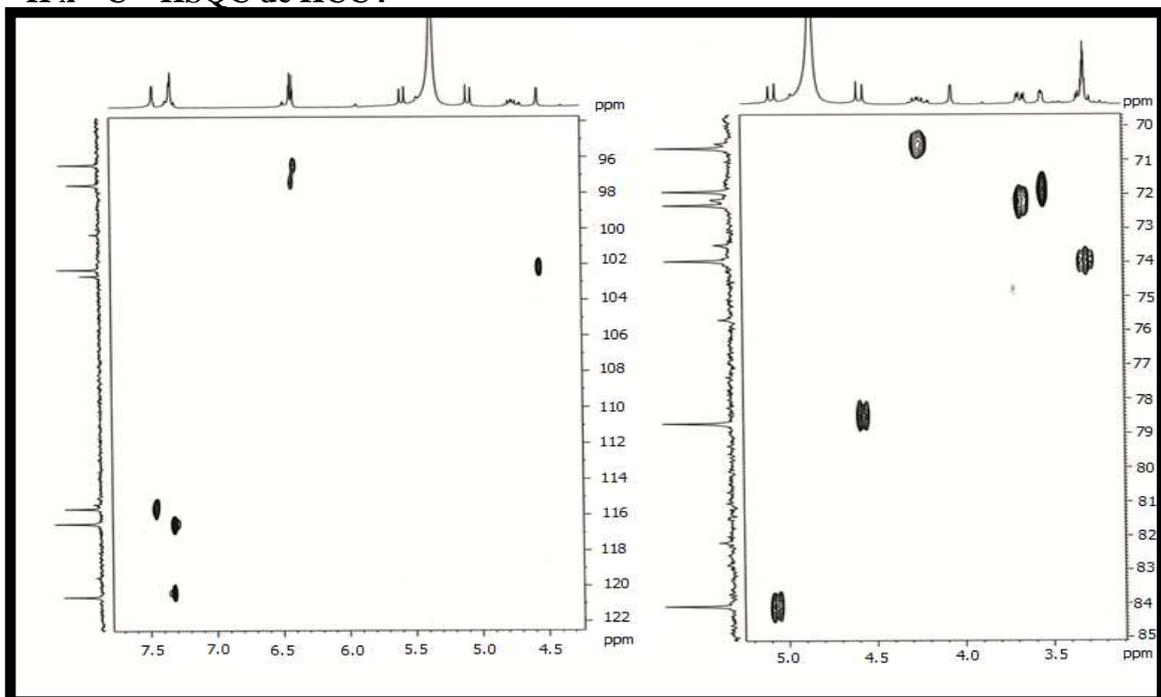


Figura 23 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-4

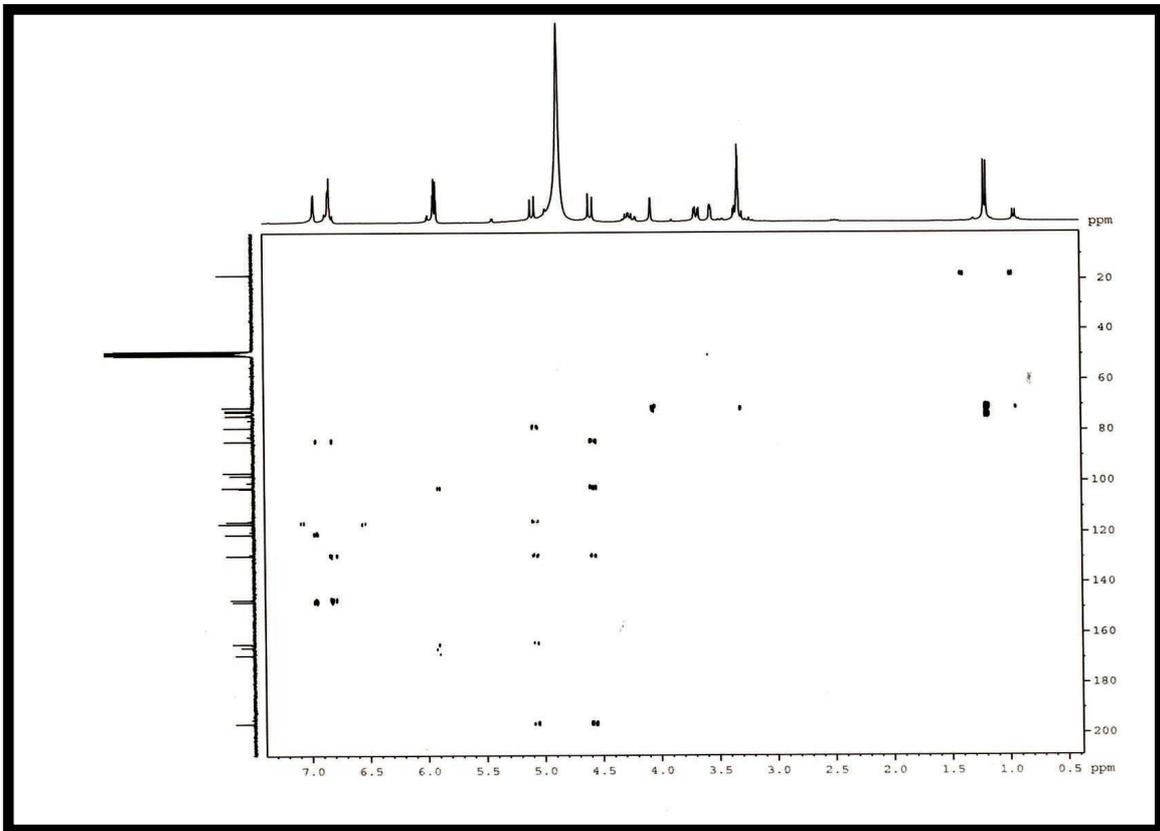


Figura 24 - Expansão 1 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-4

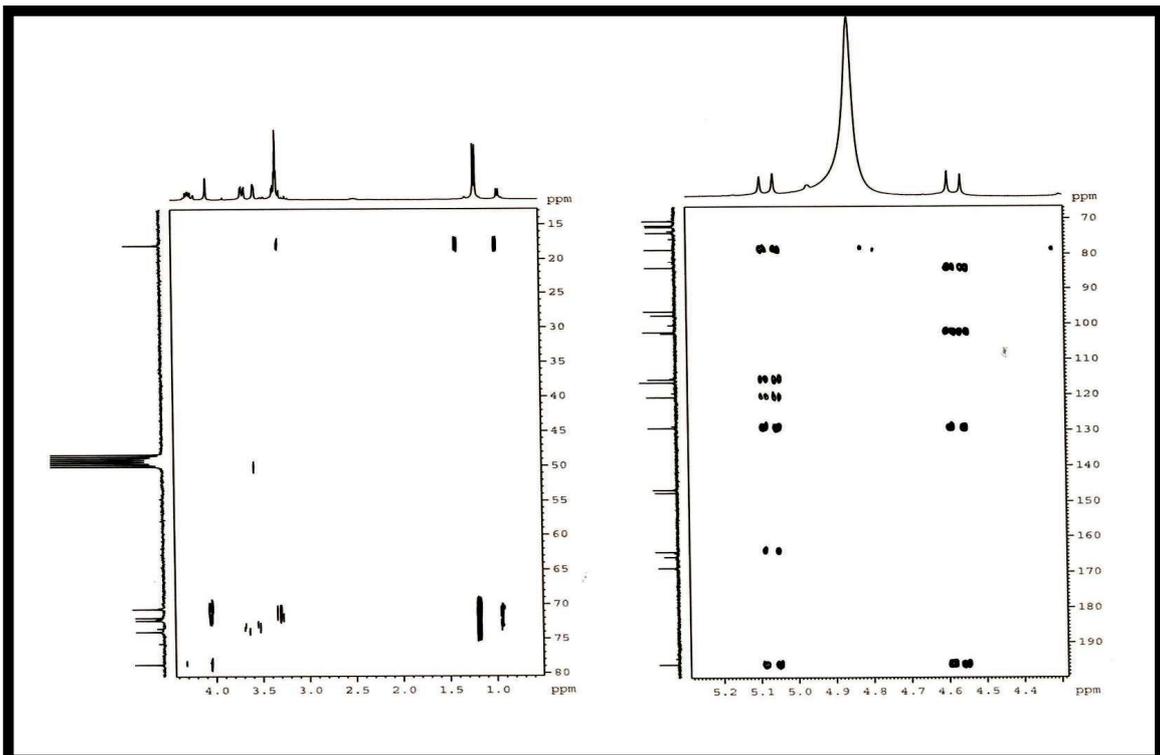


Figura 25 - Expansão 2 do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-4

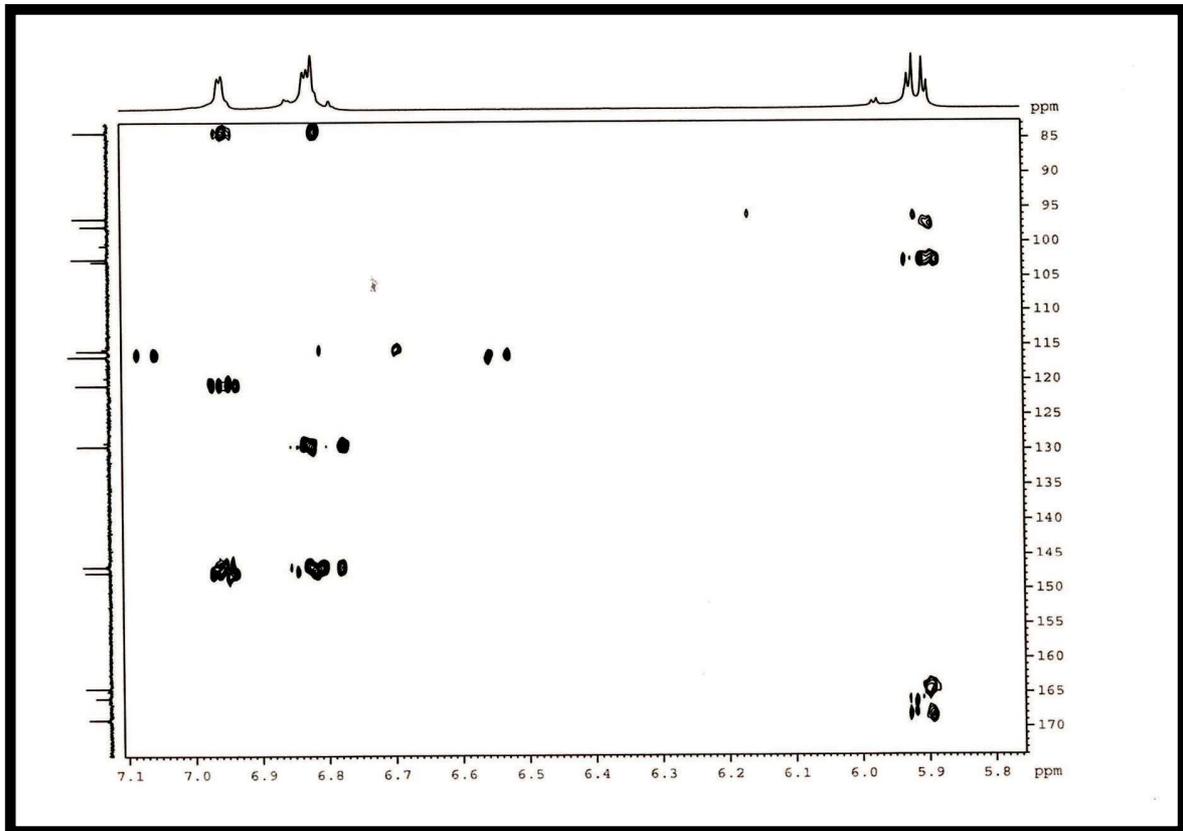
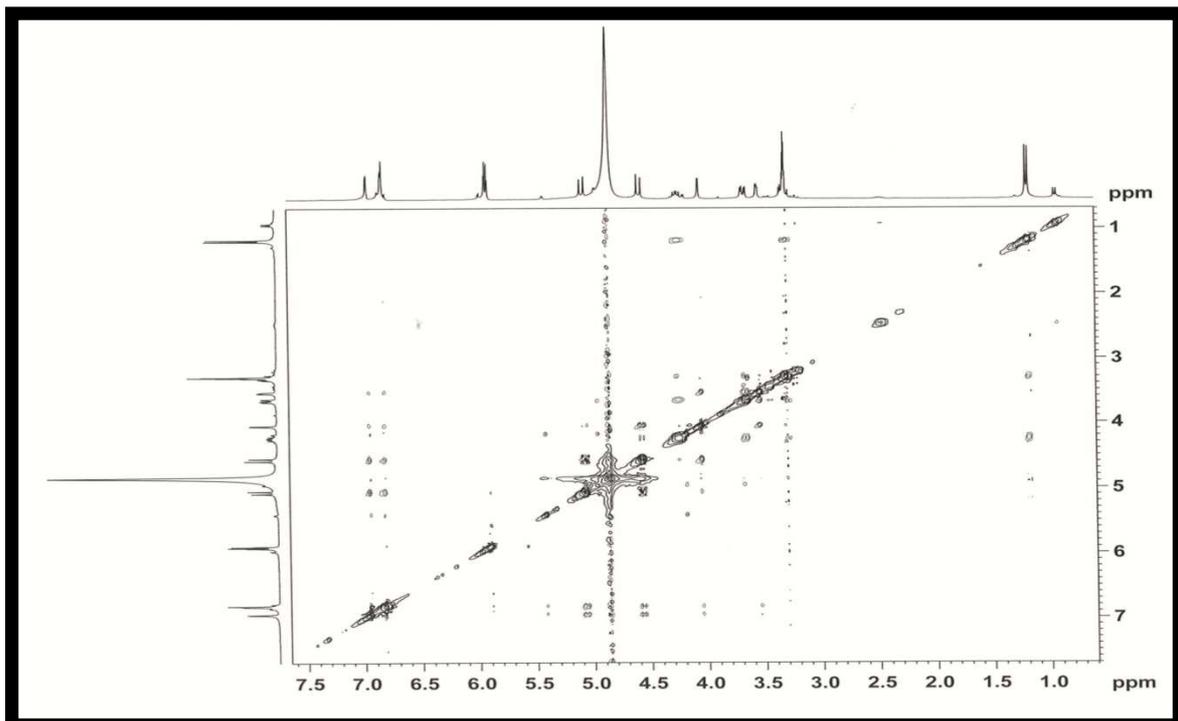


Figura 26 - Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY (500 MHz; CD_3OD) de HCC-4



5.1.2.2 Determinação estrutural de HCC-5

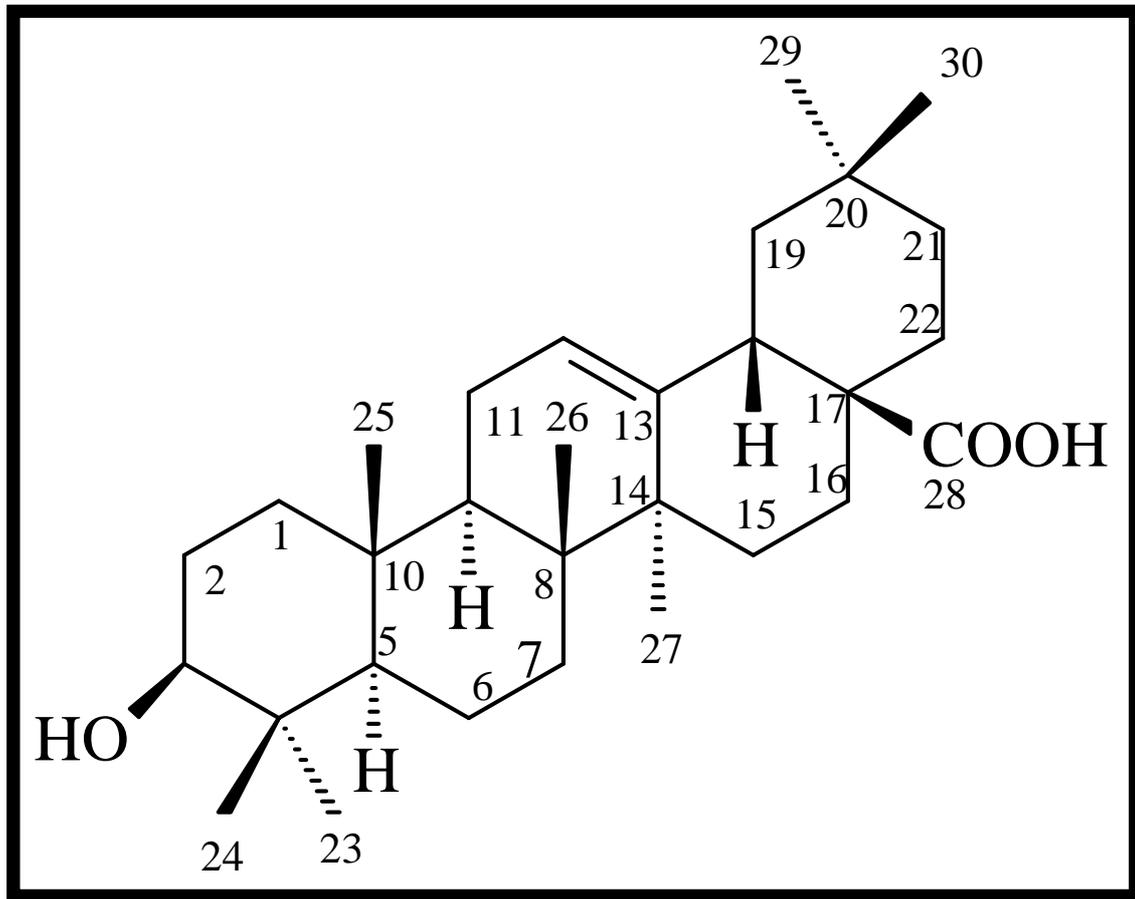
A substância denominada HCC-5 foi isolada sob a forma de um sólido amorfo branco, solúvel em diclorometano, com ponto de fusão na faixa de 305 - 306 °C.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de HCC-5 (Figura 28, pág. 78) apresentou a presença de singletos em δ_{H} 0,78; 0,81; 0,91; 0,95; 0,98 e 1,16, característicos de sinais de átomos de hidrogênio de grupamentos metila. Além disso, esse espectro apresentou um duplo dubleto em δ_{H} 3,15 ($J = 5,0$ e $9,8$ Hz), característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado e um singleto largo em δ_{H} 5,24, que foi atribuído a sinal de hidrogênio ligado a átomo de carbono de dupla ligação.

Corroborando com os dados já apresentados, o espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de HCC-5 (Figura 30, pág. 79) revelou a presença de trinta sinais, sendo um destes em δ_{C} 79,7, referente a sinal de carbono oxigenado (C-3), e outro em δ_{C} 182,12 que pode ser atribuído a sinal de carbono do grupo carboxila (C-28). Este espectro ainda apresentou sinais em δ_{C} 123,81 e 145,37, que permitiram identificar a ligação dupla trissubstituída entre C12-C13.

A análise do DEPT 135° permitiu a caracterização do padrão de hidrogenação relativo a cada átomo de carbono, bem como distinção daqueles não hidrogenados pela subtração espectral, revelando a presença de sete átomos de carbono metílicos (CH_3), dez carbonos metilênicos (CH_2), cinco carbonos metínicos (CH) e sete carbonos não-hidrogenados (C). O resultado da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , bem como dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC e HMBC e dos espectros bidimensionais de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY de HCC-5 mostrados nas Figuras 28 a 42 (pág. 78-85), e a comparação desses dados com achados descritos na literatura (MAHATO; KUNDU, 1994), permitiram identificar HCC-5 como um triterpeno denominado ácido oleanólico, cuja estrutura química encontra-se demonstrada na Figura 27. A Tabela 9 mostra a comparação dos dados espectroscópicos de HCC-5 com os do ácido oleanólico descrito na literatura.

Figura 27 - Estrutura química de HCC-5



Nome químico: ácido 3 β -hidroxi-olean-12-en-28-óico

Tabela 9 - Dados espectroscópicos de HCC-5 comparados com aqueles descritos na literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) para ácido oleanólico

	HSQC		HMBC		Literatura (CDCl ₃)
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, mult., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)
C					
4	40,72				38,7
8	38,34		3H-26	3H-27	39,3
10	38,34				37,0
13	145,37		H-18	3H-27	143,4
14	43,05		3H -27	3H-26	41,6
17	47,80				46,6
20	31,78		3H-29; 3H-30		30,6
28	182,12				181,0
CH					
3	79,87	3,15 (dd, 5,0, 9,8)		3H-23; 3H - 24	78,7
5	56,93	0,75 (sl)		3H-23; 3H-24	55,2
9	48,82			3H-25; 3H-26	47,6
12	123,81	5,24 (sl)		H - 12	122,1
18	42,90	2,85 (m)		H - 18	41,3
CH₂					
1	40,00				38,5
2	28,03				27,4
6	19,67				18,3
7	33,98				32,6
11	24,68				23,1
15	28,90			3H-27	27,7
16	24,68				23,4
19	47,41			3H-29; 3H-30	45,8
21	35,07			3H-29	33,8
22	33,98				32,3
CH₃					
23	29,00	0,98 (s)			28,1
24	16,48	0,78 (s)			15,6
25	16,05	0,95 (s)			15,3
26	17,89	0,81 (s)			16,8
27	26,34	1,16 (s)			26,0
29	33,73	0,91 (s)			33,1
30	23,90	0,95 (s)			23,6

Figura 28 - Espectro de RMN - ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HCC-5

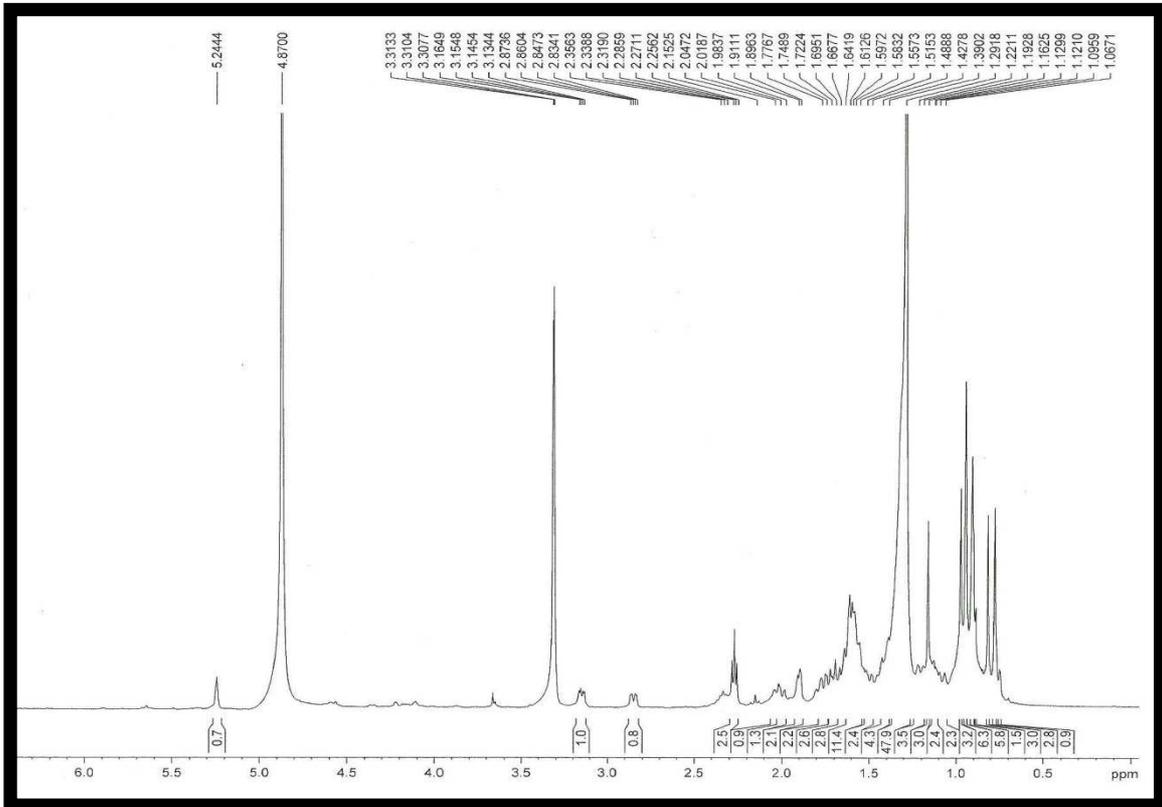


Figura 29 - Expansão do espectro de RMN - ^1H (500 MHz; CDCl_3) de HCC-5

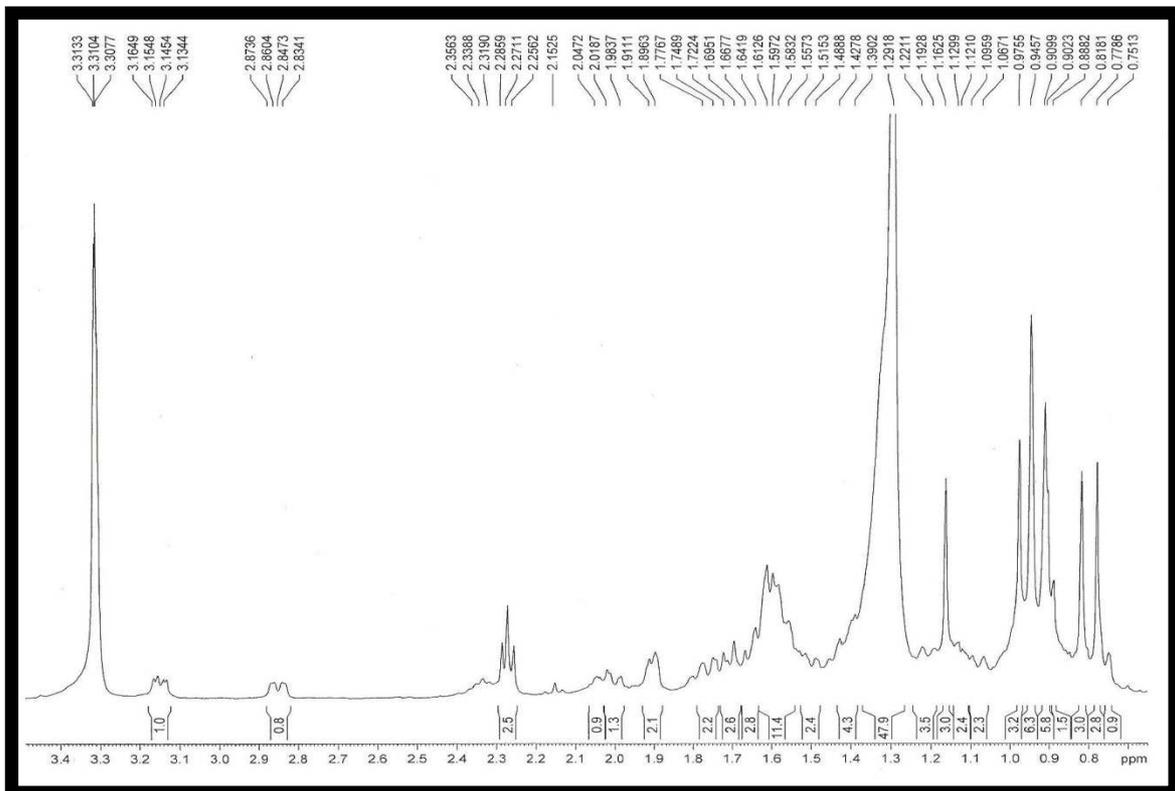


Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5

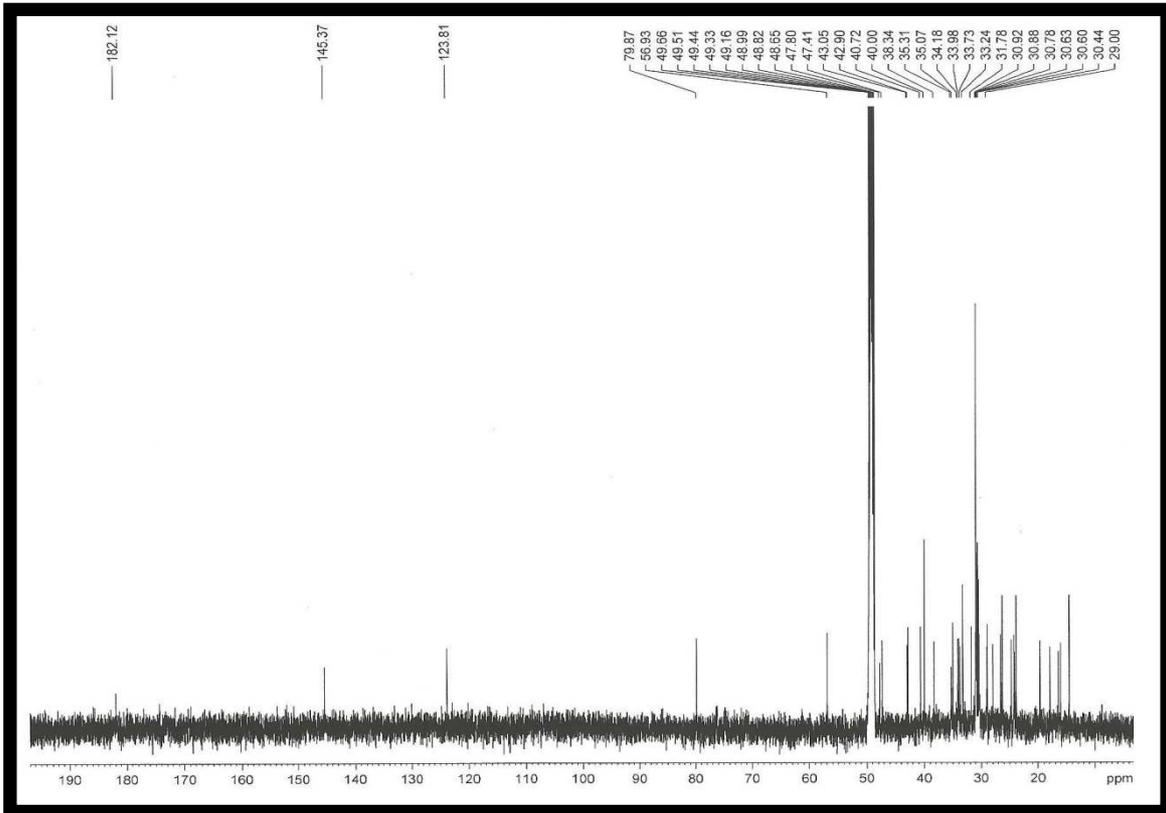


Figura 31 – Expansão 1 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5

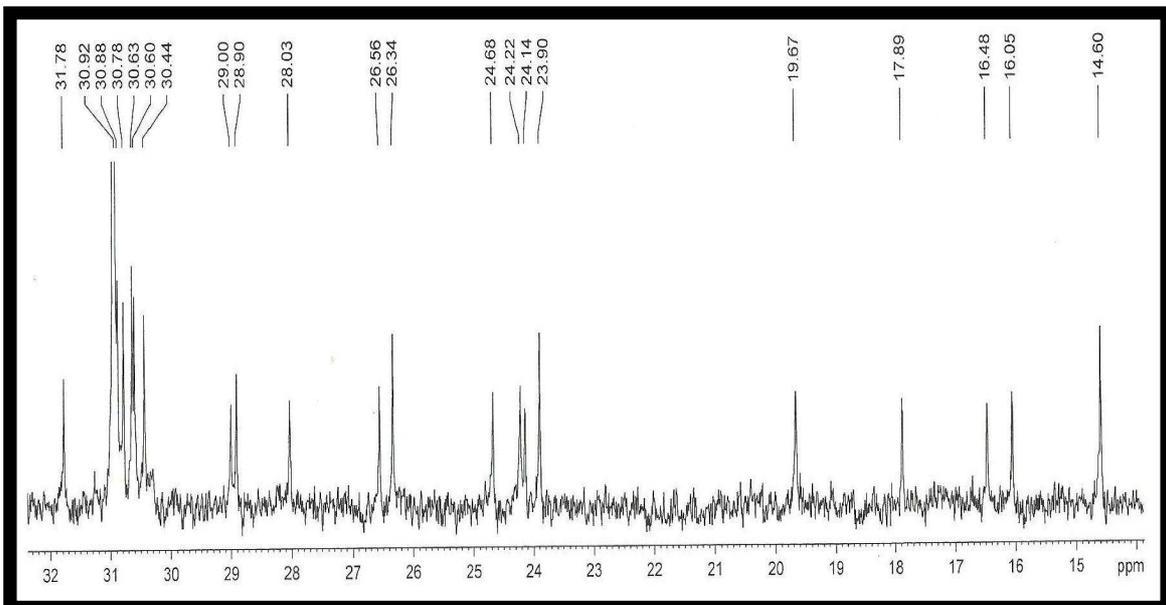


Figura 32 – Expansão 2 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5

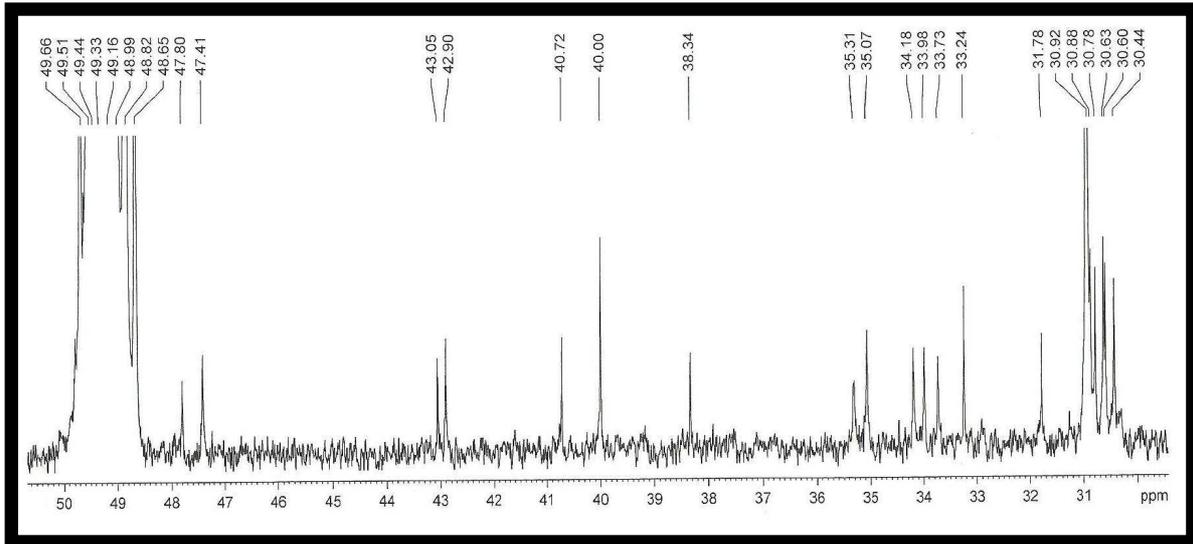


Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5

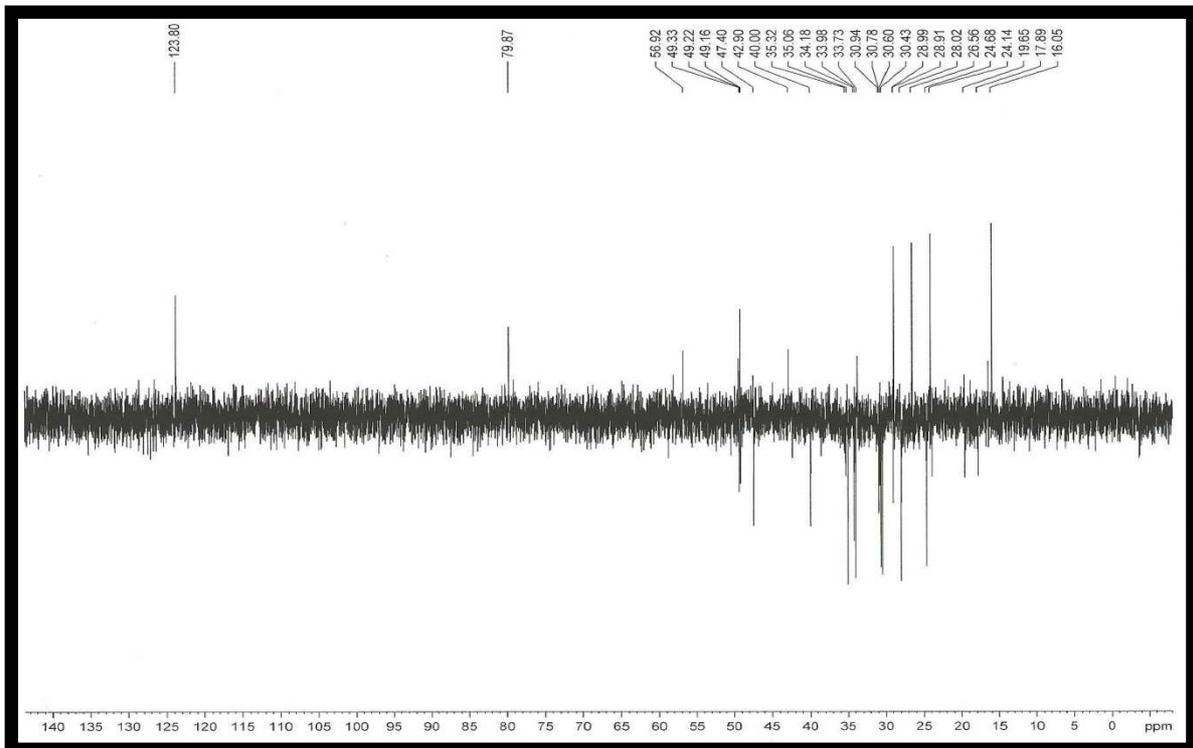


Figura 34 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° (125 MHz; CDCl_3) de HCC-5

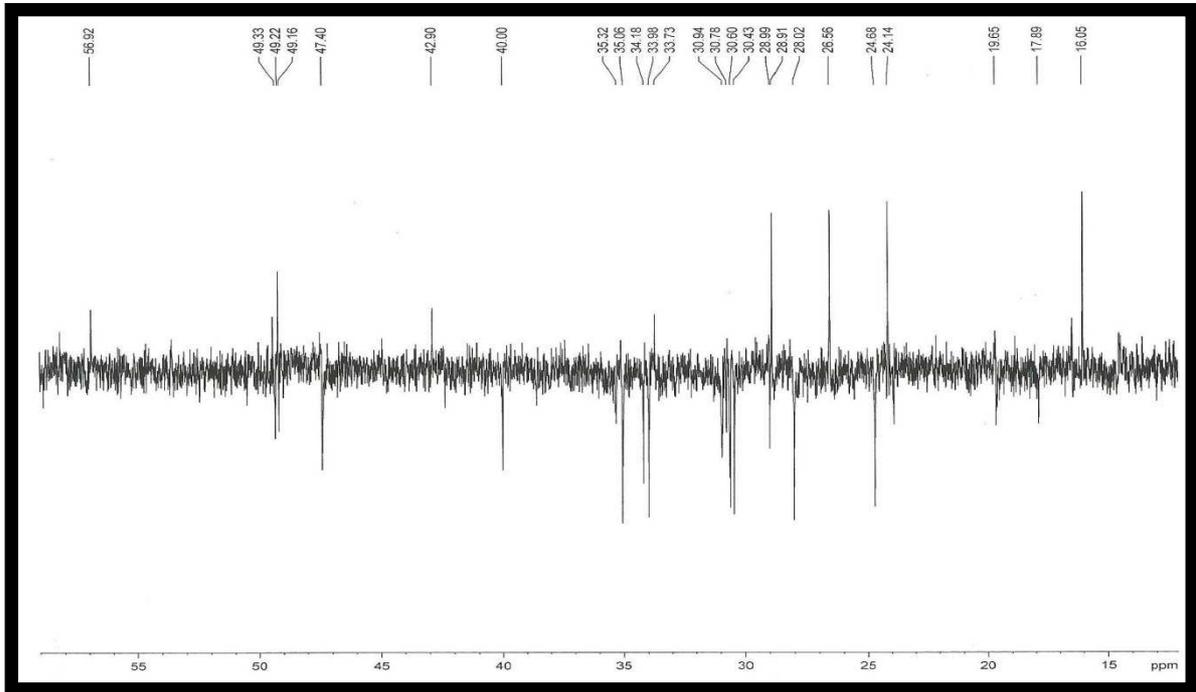


Figura 35 - Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-5

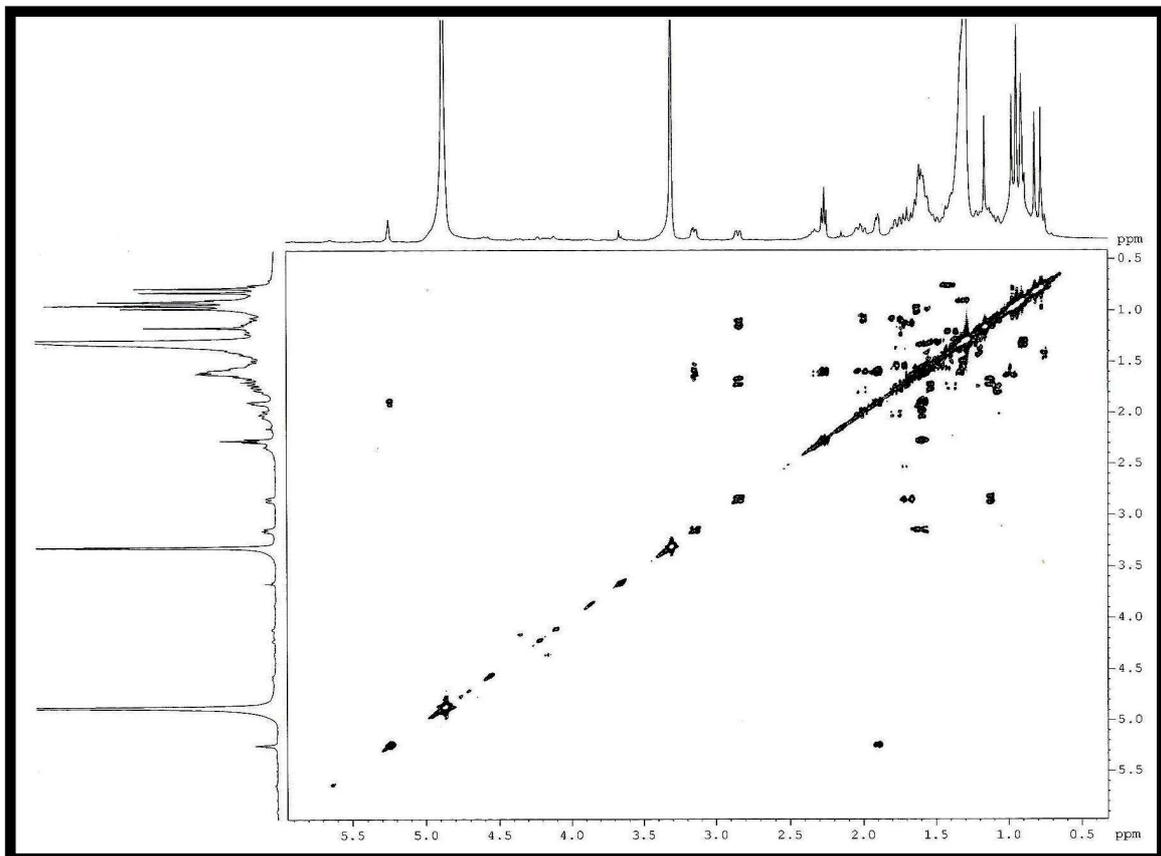


Figura 36 - Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de HCC-5

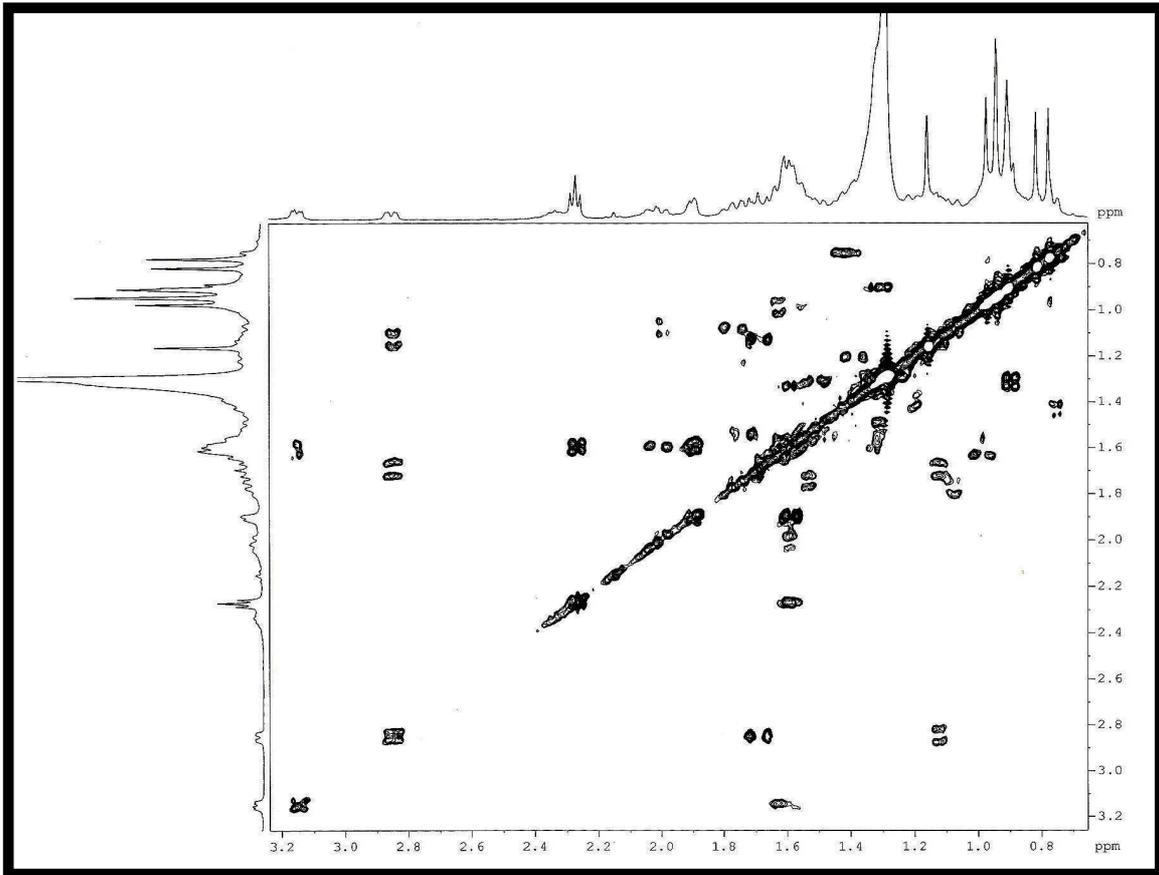


Figura 37 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de HCC-5

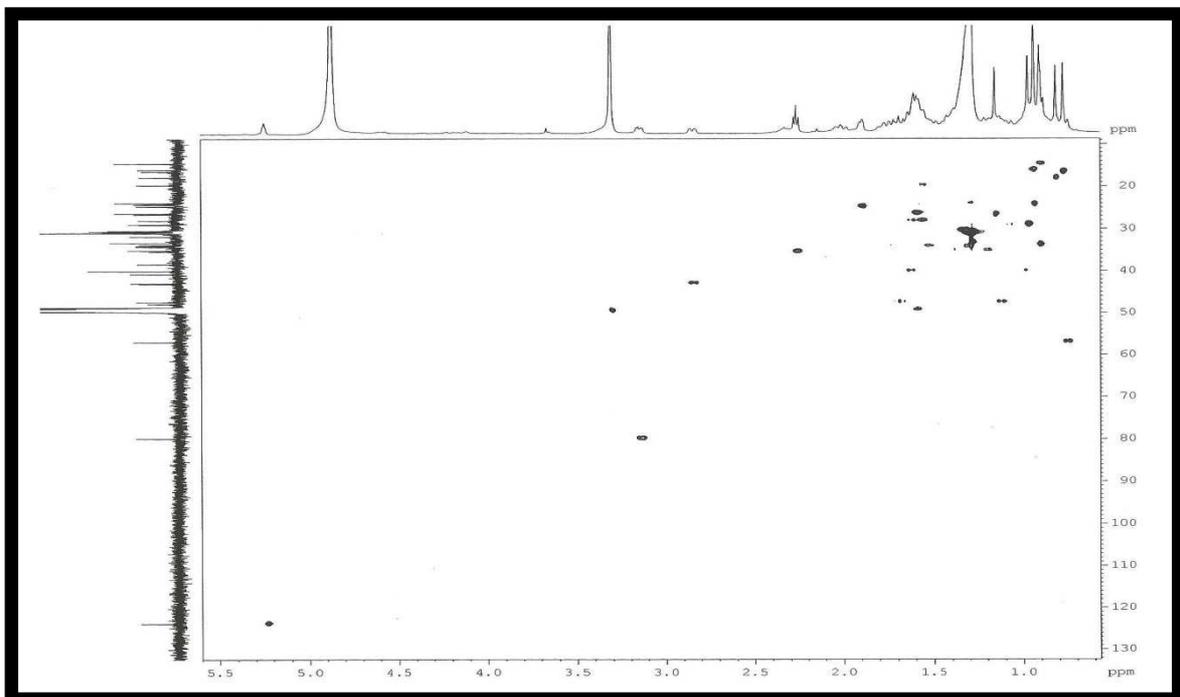


Figura 38 - Expansão 1 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de HCC-5

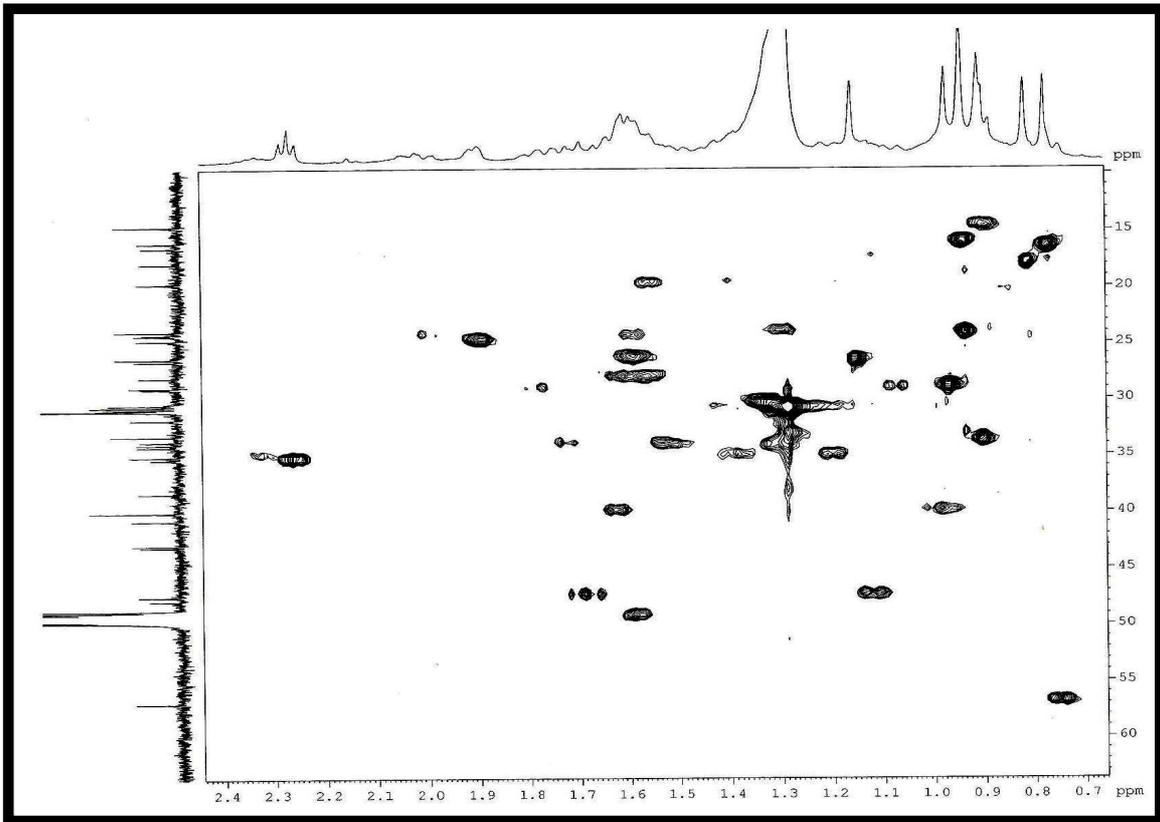


Figura 39 - Expansão 2 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de HCC-5

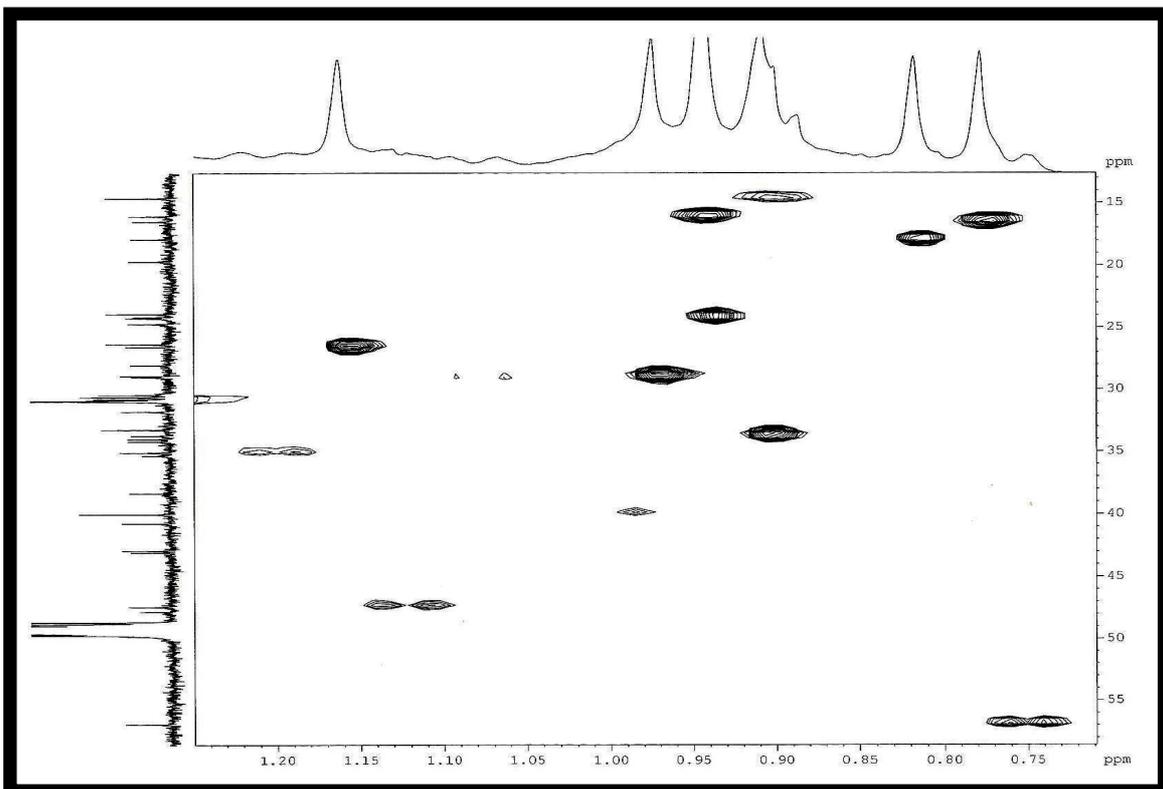


Figura 40 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-5

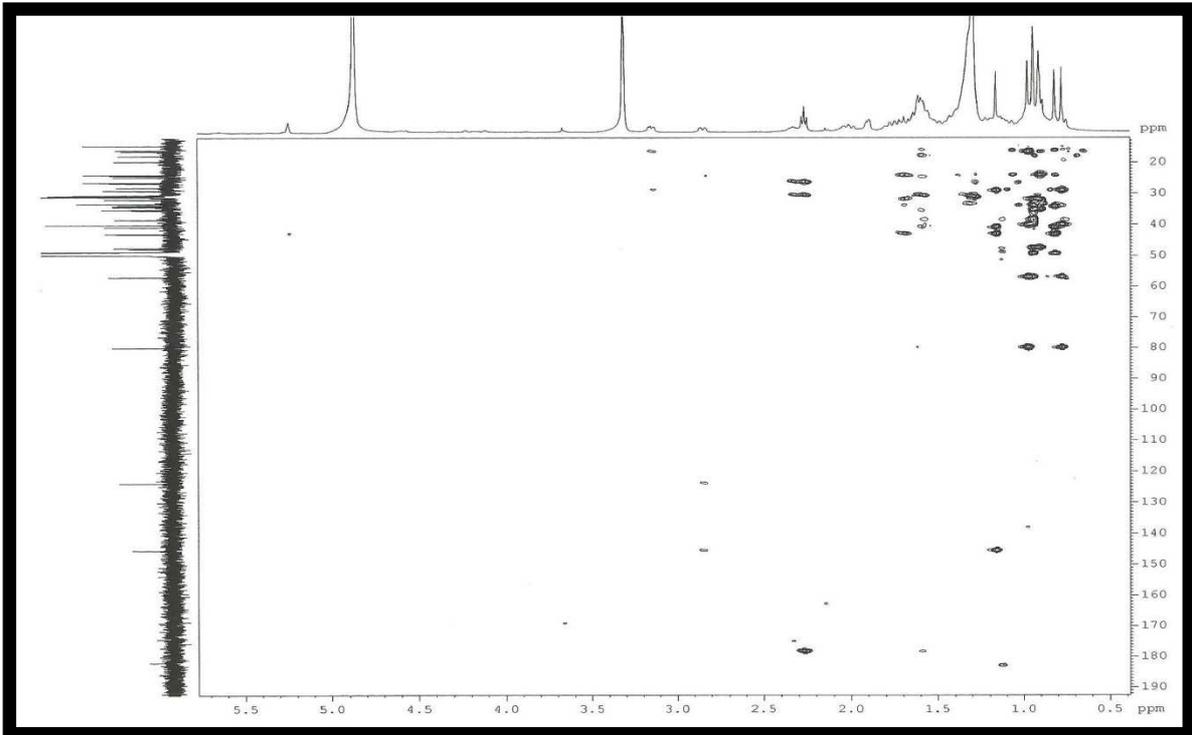


Figura 41 - Expansão 1 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de HCC-5

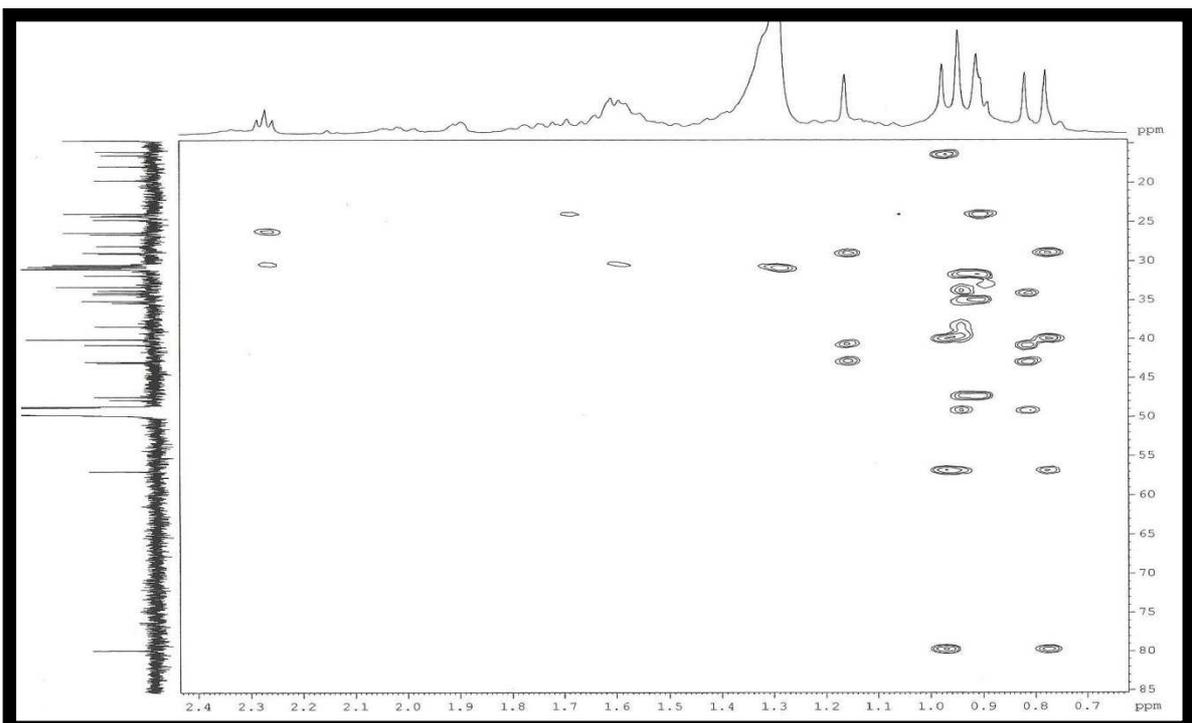
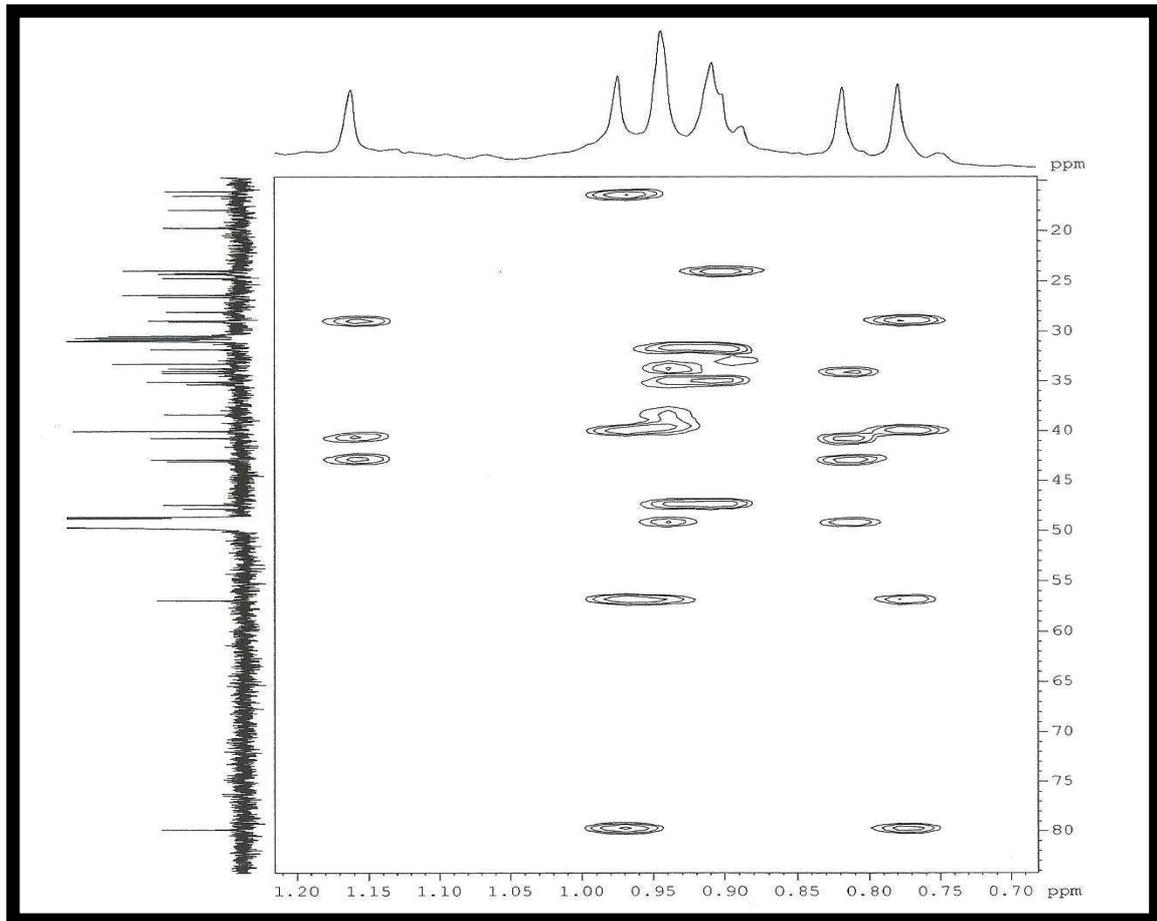


Figura 42 - Expansão 2 do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC de HCC-5



5.2 Estudo das atividades biológicas de *H. courbaril* L.

5.2.1 Avaliação da atividade antioxidante do EEHC e suas frações através do teste do DPPH

A adição de diferentes concentrações de EEHC, FD, FDAE, FAE e FM na solução de DPPH induziu uma diminuição na absorbância e o consumo do radical foi dependente de concentração de amostra adicionada ao meio de reação. EEHC, FD, FDAE, FAE e FM, na concentração de 1000 µg/mL, inibiram a formação de radical livre em 99,8%, 99,6%, 99,9%, 99,6% e 99,6%, respectivamente.

EEHC, FAE e FM apresentaram atividade sequestradora de radicais livres com valores de CI_{50} iguais a $3,07 \pm 0,18$ µg/mL; $5,05 \pm 1,5$ µg/mL e $5,12 \pm 0,73$ µg/mL, respectivamente. Esses valores foram próximos daquele apresentado pelo Trolox, correspondente a $2,6 \pm 0,23$ µg/mL, que é um padrão positivo para atividade antioxidante. Os resultados mostraram que EEHC, FD, FDAE, FAE e FM apresentaram atividade antioxidante, sendo EEHC, FAE e FM as amostras com maior eficácia (Tabela 10).

Tabela 10 - Avaliação da atividade antioxidante do EEHC e suas frações usando o método de sequestro do radical DPPH

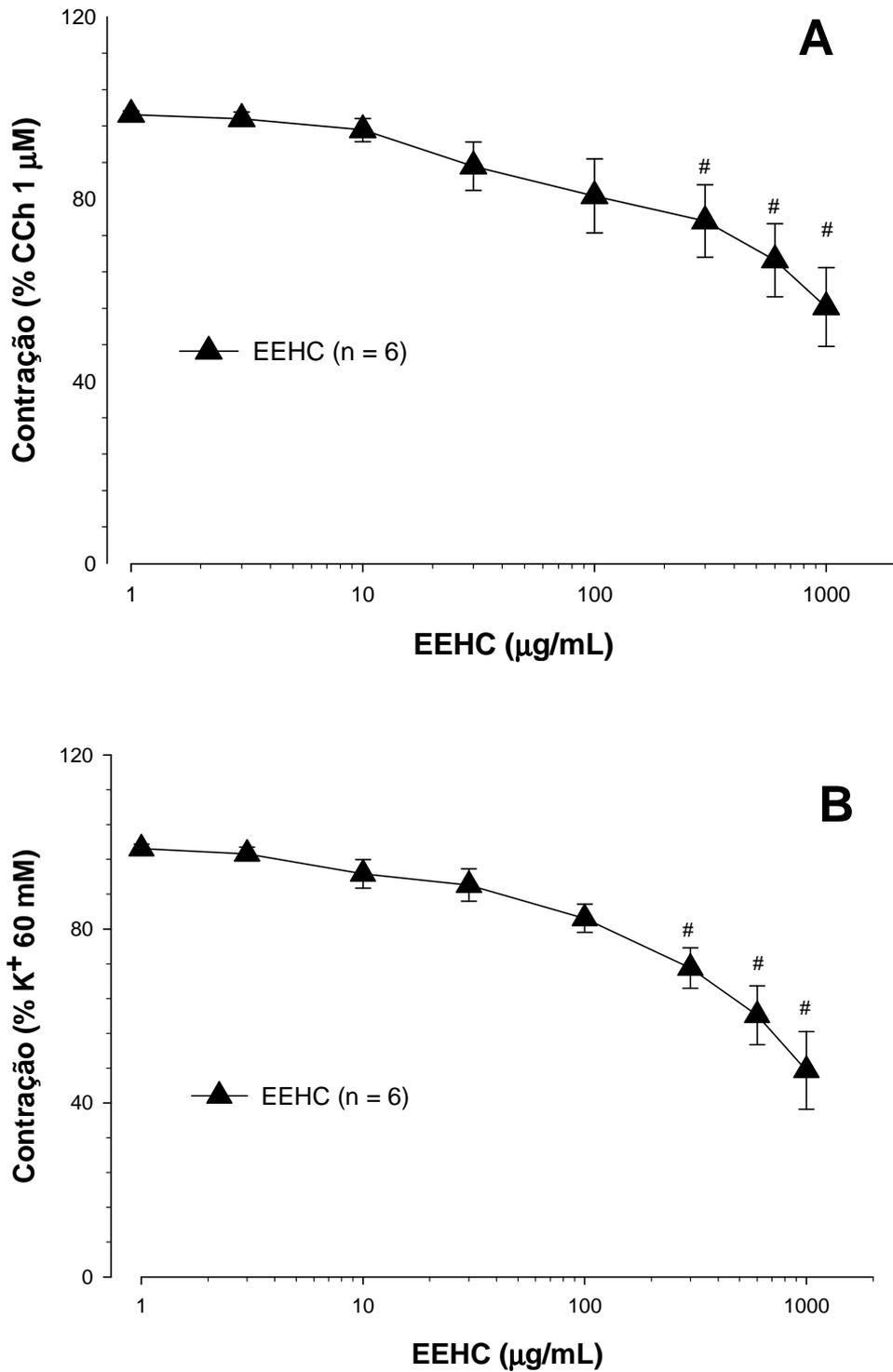
Concentração (µg/mL)	1,0	2,0	4,0	5,0	10,0	50,0	100,0	1000,0	CI_{50}
EEHC	18%	29,4%	64,2%	83,8%			99,7%	99,8%	$3,07 \pm 0,18$
FD	1,3%	-	-	5,8%	10,7%	45,7%	70,2%	99,6%	$66,3 \pm 6,9$
FDAE	0,5%	-	-	6,4%	13,4%	73,8	94,8%	99,9%	$34,0 \pm 0,24$
FAE	11,9%	-	-	49,6%	85,5%	96,9%	99,5%	99,6%	$5,05 \pm 1,5$
FM	11,5%	18,6%	37,8%	49,2%	-	-	99,5%	99,6%	$5,12 \pm 0,73$
TROLOX	24,5%	41,8%	51,8%	86,5%	-	-	99,8%	99,9%	$2,6 \pm 0,23$

Os valores de CI_{50} representam a média \pm E.P.M

5.2.2 Efeito da adição in vitro de EEHC, frações ou astilbina na contração induzida por CCh ou KCl em músculo liso traqueal de rato

A adição de carbacol (1 μ M) ou KCl (60 mM) ao banho contendo anéis traqueais de rato produziu contrações sustentadas. Após estabelecido o platô, EEHC, de maneira cumulativa, foi adicionado ao banho para a realização da curva concentração-efeito. A Figura 43 (pág. 88) mostra o efeito de EEHC sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de rato. Observou-se que EEHC foi capaz de reverter parcialmente a resposta contrátil do músculo liso traqueal de rato pré-contraído por CCh (A) ou K^+ (B), apresentando valores de relaxamento correspondentes a $56,25 \pm 8,65\%$ e $47,47 \pm 8,9\%$, respectivamente, da resposta contrátil obtida antes da adição do extrato. O relaxamento produzido por EEHC na contração induzida por CCh foi estatisticamente significante a partir da concentração de 300 μ g/mL, reduzindo a resposta contrátil para $75,13 \pm 8,0\%$ da resposta contrátil observada na ausência do extrato e na contração induzida por K^+ , EEHC também promoveu relaxamento estatisticamente significante a partir da concentração de 300 μ g/mL, que, neste caso, reduziu a resposta contrátil para $71,00 \pm 4,67\%$ da resposta inicialmente observada na ausência do extrato ($p < 0,05$, one way, ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 43 - Efeito do EEHC sobre a contração induzida por CCh (A) ou K^+ (B) em traqueia isolada de rato

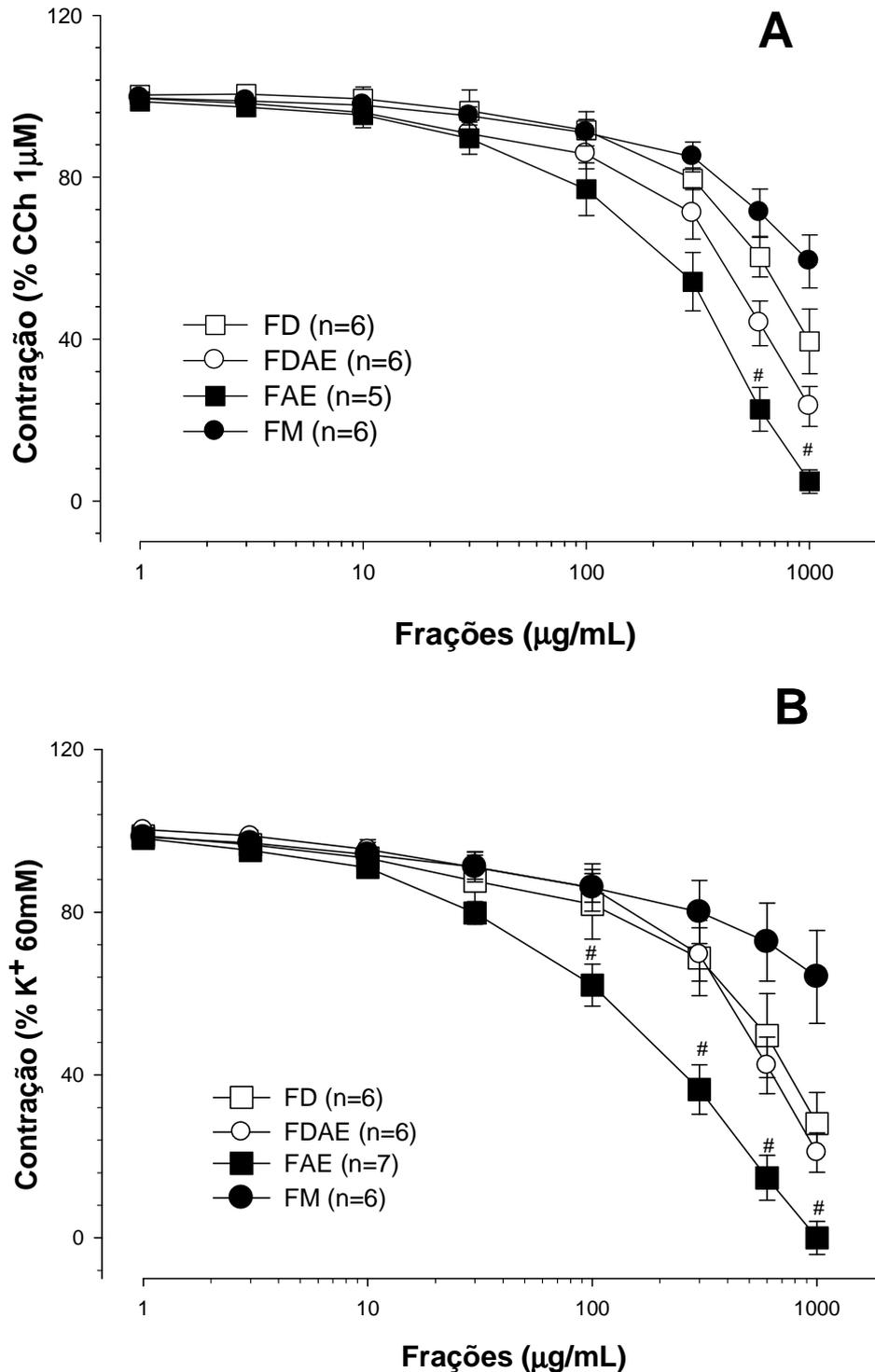


Representação gráfica dos efeitos miorelaxantes induzidos por adições cumulativas (1-1000 μ g/mL) de EEHC (triângulo preto, n = 6-6) nas contrações induzidas por CCh (A) e K^+ (B). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. O símbolo # representa significância ($p < 0,05$, one way, Tukey) quando comparado com o valor inicial da contração induzida por CCh ou K^+ .

Tendo em vista o potencial miorrelaxante apresentado pelo extrato etanólico de *H. courbaril* (EEHC), decidiu-se avaliar o efeito das frações obtidas do seu tratamento cromatográfico na contratilidade da musculatura lisa traqueal de rato. A adição cumulativa das frações FD, FDAE, FAE e FM também foi capaz de reverter a resposta contrátil induzida por CCh ou K^+ (Figura 44, A e B, pág. 90). Na contração induzida por CCh, FD, FDAE e FM apresentaram valores de relaxamento correspondentes a $39,46 \pm 7,99\%$ e $23,38 \pm 4,94\%$ $59,21 \pm 6,56\%$, respectivamente, da resposta contrátil inicial de referência. FD, FDAE e FM promoveram relaxamento estatisticamente significativo ($p < 0,05$, one way, Tukey) a partir da concentração de $600 \mu\text{g/mL}$, reduzindo a resposta contrátil, neste caso, para $60,30 \pm 5,0\%$, $43,91 \pm 5,5\%$ e $71,25 \pm 5,8\%$, respectivamente, da contração inicial induzida por CCh. Por outro lado, na contração induzida por K^+ , o relaxamento produzido por FD e FDAE foi estatisticamente significativo a partir da concentração de $600 \mu\text{g/mL}$, que neste caso, reduziu a resposta contrátil para $49,67 \pm 10,3\%$ e $42,37 \pm 7,0\%$, respectivamente, da resposta inicial observada na ausência das frações, enquanto FM promoveu relaxamento estatisticamente significativo a partir da concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, reduzindo a resposta contrátil, neste caso, para $86,05 \pm 5,81\%$ da contração inicial induzida por esse agente contraturante.

FAE se mostrou capaz de reverter completamente as contrações induzidas por esses agonistas. O relaxamento produzido por FAE na contração induzida por CCh foi estatisticamente significativo a partir da concentração de $600 \mu\text{g/mL}$, reduzindo a resposta contrátil para $22,68 \pm 5,4\%$ da resposta observada na ausência da fração, enquanto que na contração induzida por K^+ , FAE promoveu relaxamento estatisticamente significativo a partir da concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, que neste caso, reduziu a resposta contrátil para $62,07 \pm 5,2\%$ da resposta contrátil observada na sua ausência. Além disso, os resultados mostraram que FAE foi mais potente em reverter a contração induzida por KCl (CI_{50} de $110,6 [77,1 - 158,6 \mu\text{g/mL}]$; $n = 7$), que aquela induzida por CCh (CI_{50} de $287,1 [157,8 - 523,2 \mu\text{g/mL}]$; $n = 5$; $p < 0,05$, Mann-Whitney).

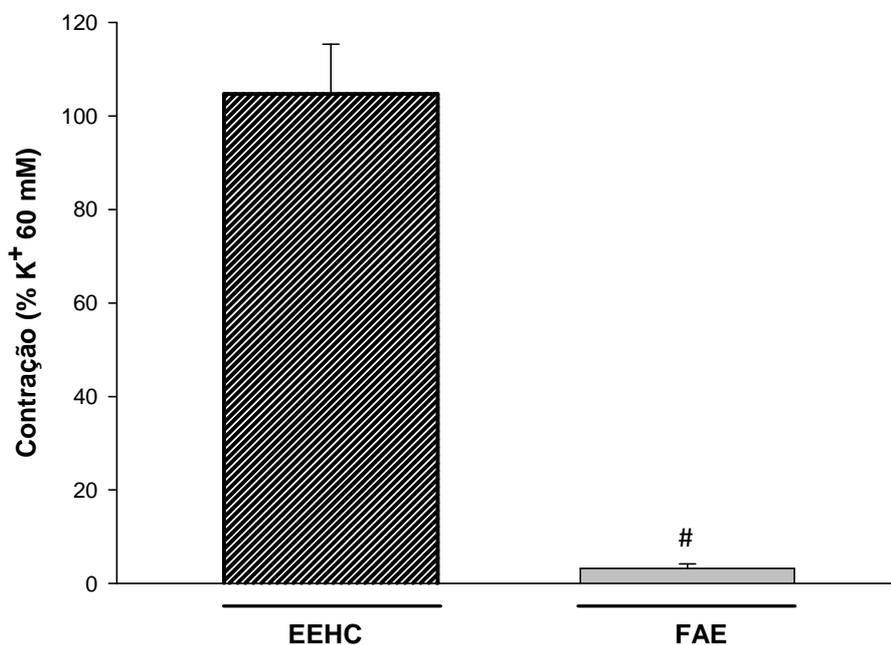
Figura 44 - Efeito de FD, FDAE, FAE e FM sobre a contração induzida por CCh ou K⁺ em traqueia isolada de rato



Representação gráfica dos efeitos mio-relaxantes induzidos por adições cumulativas (1-1000 µg/mL) de FD (quadrado branco, n = 6-6), FDAE (círculo branco, n = 6-6), FAE (quadrado preto, n = 5-7) e FM (círculo preto, n = 6-6) nas contrações induzidas por CCh (A) ou K⁺ (B). Cada ponto representa a média ± E.P.M. O símbolo # representa significância (p < 0,001, one way, Tukey) quando comparado com o valor inicial da contração induzida por CCh ou K⁺.

Após a observação das propriedades miorreloxantes de EEHC e suas frações, especialmente, FAE, verificou-se a capacidade de recuperação do tecido, onde os efeitos da exposição a essas amostras na responsividade traqueal foram avaliados. Na Figura 45 pode-se observar que o efeito da exposição ao EEHC foi reversível, uma vez que, ao final do experimento, após sucessivas lavagens com solução fisiológica e a posterior adição de K^+ 60 mM produziu uma resposta contrátil correspondente a $104,71 \pm 10,63\%$ da resposta contrátil induzida pelo mesmo agente contraturante no início dos experimentos. Enquanto que a adição de K^+ 60 mM após a exposição à FAE produziu uma resposta contrátil significativamente menor ($p < 0,001$, test t, Rank Sun) correspondente a $3,19 \pm 0,97\%$ da resposta contrátil induzida pelo K^+ no início dos experimentos.

Figura 45 - Efeito da adição de K^+ ao banho contendo tecido traqueal de rato após a sua exposição à EEHC ou FAE



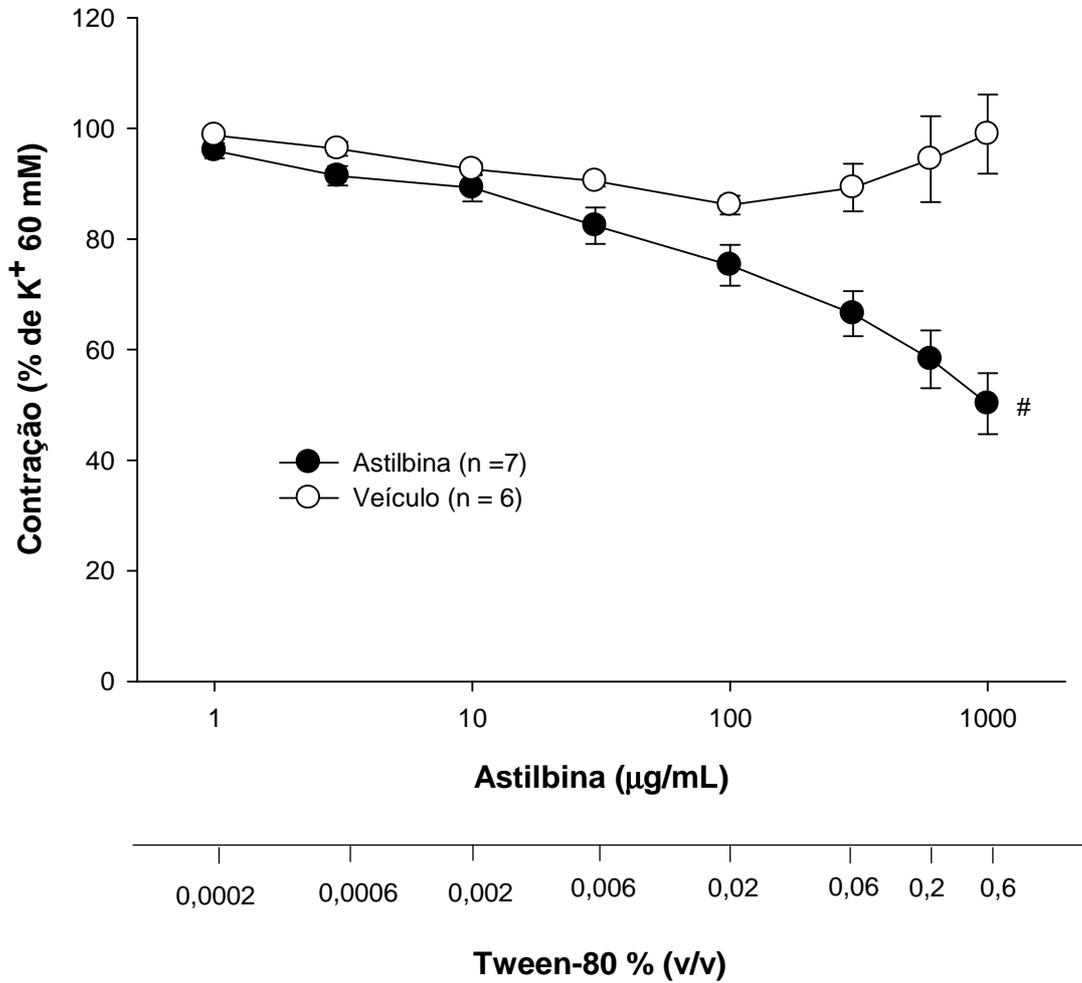
Representação gráfica do efeito da adição de K^+ 60 mM aos anéis de traqueia anteriormente expostos a EEHC ($n = 4$) ou FAE ($n = 7$). Após a CCE realizada pela adição cumulativa de EEHC ou FAE, o tecido foi lavado sucessivas vezes com solução fisiológica e, em seguida, adicionou-se K^+ 60 mM. Os resultados representam a média \pm E.P.M. O símbolo # representa significância ($p < 0,001$, test t, Rank Sum).

Diante dos resultados obtidos com as frações de *H. courbaril*, realizou-se o tratamento cromatográfico da fração que apresentou maior eficácia para efeitos miorelaxantes em traqueia de rato, FAE, o que resultou no isolamento e caracterização do flavonóide denominado astilbina. Com esse metabólito secundário, foi realizado o protocolo de reversão da contração induzida por K^+ , uma vez que FAE foi mais potente em reverter a contração induzida por esse agente contraturante quando comparado à sua ação na contração induzida por carbacol.

Na Figura 46 (pág. 93) pode-se observar que a adição cumulativa de astilbina (1 - 1000 $\mu\text{g/mL}$), foi capaz de relaxar parcialmente anéis de traqueia de rato pré-contraídos por K^+ , apresentando relaxamento máximo de $49,8 \pm 5,5\%$. O relaxamento produzido por astilbina na contração induzida por K^+ foi estatisticamente significativa a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, que, nesse caso, reduziu a resposta contrátil para $75,26 \pm 3,7\%$ da resposta contrátil observada na sua ausência.

O tratamento das preparações traqueais pré-contraídas com K^+ apenas com o veículo (Tween 80) não apresentou resposta significativa quando comparada com a resposta contrátil máxima de K^+ observada na sua ausência.

Figura 46 - Efeito de astilbina (HCC-4) sobre a contração induzida por K^+ em traqueia isolada de rato



Representação gráfica do efeito miorelaxante provocado por adições cumulativas de astilbina (HCC-4) (1-1000 $\mu\text{g/mL}$, n = 7) nas contrações induzidas por K^+ . O intervalo entre a adição de uma concentração e outra foi de cinco minutos. Veículo (Tween, n = 6). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. # $p < 0,001$, one way, Tukey, quando comparado com o valor inicial da contração induzida por K^+ .

5.2.3 Efeito de FAE na curva concentração-efeito induzida pela adição de Ca^{2+} em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina

Na ausência de FAE, em preparações traqueais mantidas em meio sem Ca^{2+} , a adição de concentrações cumulativas de Ca^{2+} (0,1 – 50 mM) produziu contrações sustentadas de maneira dependente de concentração ($p < 0,001$, ANOVA, $n = 13$). Em seguida, realizou-se uma nova curva concentração-efeito ao Ca^{2+} , mas agora na presença de 300 $\mu\text{g/mL}$ de FAE. Nessa ocasião, foi possível perceber que não houve diferença estatística significativa do valor máximo alcançado correspondente a $90,41 \pm 11,79\%$ da contração de referência obtida na ausência da fração ($p > 0,05$, Two way, seguido de Holm-Sidak, $n = 7$).

Por outro lado, na presença de 600 $\mu\text{g/mL}$ de FAE, a curva concentração-efeito obtida pela adição de concentrações cumulativas de Ca^{2+} (0,1 – 50 mM) foi reduzida significativamente ($p < 0,001$, Two way, seguido de Holm-Sidak, $n = 5$) para $44,46 \pm 8,44\%$ da contração obtida na ausência da fração (Figura 47, pág. 95).

Figura 47 - Efeitos de FAE nas contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso traqueal na presença de ACh (10 μM) e verapamil (10 μM)

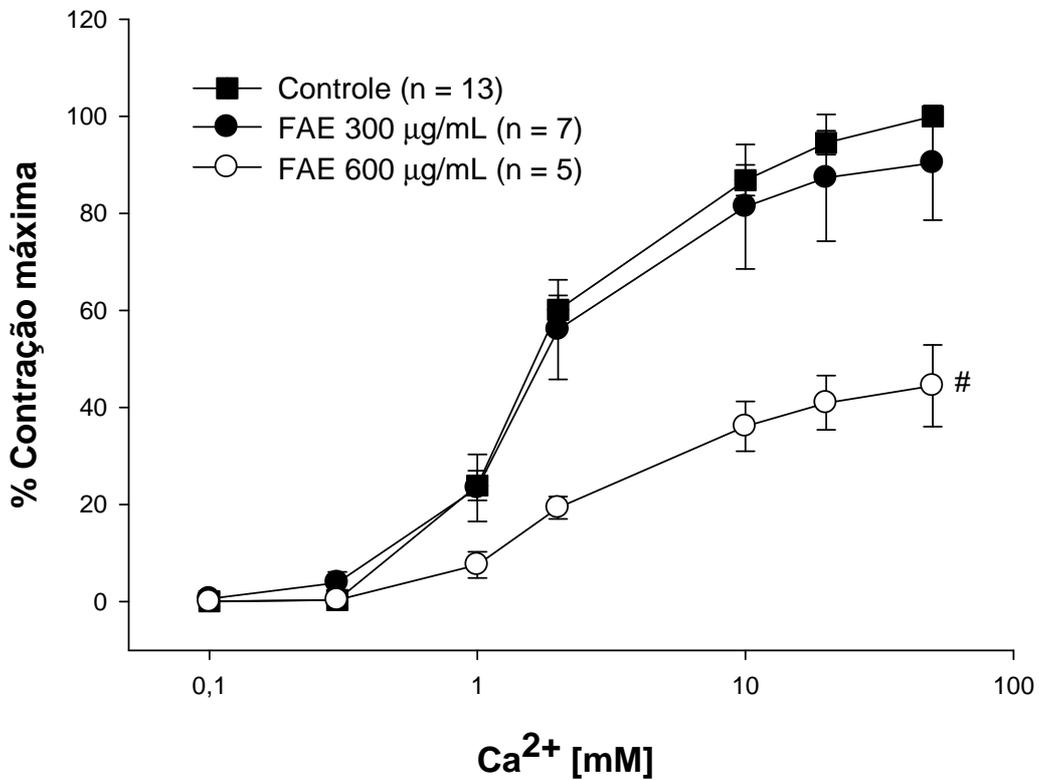


Gráfico que representa a ação de FAE 300 $\mu\text{g/mL}$ (círculo preto, $n = 7$) e 600 $\mu\text{g/mL}$ (círculo branco, $n = 5$) na curva concentração-efeito induzida pela adição cumulativa de CaCl_2 (0,1 – 50 mM). O tempo de exposição de FAE antes da adição de Ca^{2+} foi de cinco minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem da contração máxima obtida pela adição cumulativa de Ca^{2+} na ausência da fração como a média \pm E.P.M. (Curva controle, quadrado preto, $n = 13$) # $p < 0,001$, two-way ANOVA, seguido de Holm-Sidak, em comparação com o controle.

5.2.4 Efeito de FAE na curva concentração-efeito induzida pela adição de Ba²⁺ em traqueia isolada de rato mantida em meio sem Ca²⁺ na presença de acetilcolina

Em preparações traqueais mantidas em meio sem Ca²⁺, a adição cumulativa de Ba²⁺ produziu contrações crescentes e sustentadas de maneira dependente de concentração ($p < 0,001$, ANOVA, $n = 13$).

Na presença de 300 µg/mL de FAE, a curva concentração-efeito obtida pela adição de concentrações cumulativas de Ba²⁺ (0,1 – 50 mM) foi reduzida significativamente para $46,65 \pm 6,12\%$ da contração obtida na ausência da fração ($p < 0,001$, Two way, seguido de Holm-Sidak, $n = 6$); enquanto na presença de 600 µg/mL, o valor máximo alcançado pela adição de Ba²⁺ foi correspondente a $25,34 \pm 3,93\%$, valor significativamente menor do que aquele obtido na ausência da fração FAE ($p < 0,001$, Two way, seguido de Holm-Sidak, $n = 6$).

Em experimentos nos quais o verapamil (10 µM) foi usado ao invés de FAE, como controle positivo, a resposta máxima alcançada pela adição cumulativa Ba²⁺ correspondeu a $9,77 \pm 2,29\%$, valor significativamente menor do que aquele obtido na sua ausência ($p < 0,001$, Two way, seguido de Holm-Sidak, $n = 6$) (Figura 48, pág. 97).

Figura 48 - Efeitos de FAE nas contrações induzidas por Ba^{2+} em músculo liso traqueal na presença de ACh ($10\mu M$)

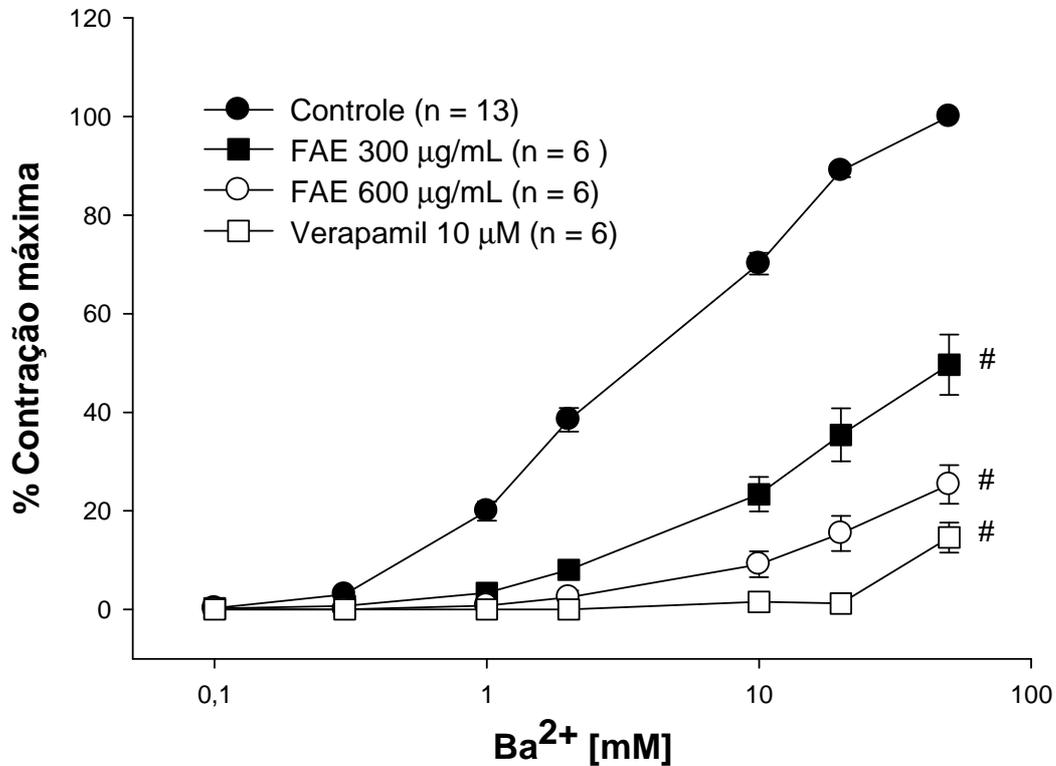


Gráfico que representa a ação de FAE 300 $\mu g/mL$ (quadrado preto, n = 6) e 600 $\mu g/mL$ (círculo branco, n = 6) ou verapamil 10 μM , controle positivo (quadrado branco, n = 6) na curva concentração-efeito induzida pela adição cumulativa de $BaCl_2$ (0,1 – 50 mM). O tempo de exposição de FAE ou verapamil antes da adição de Ba^{2+} foi de cinco minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem da contração máxima obtida pela adição cumulativa de Ba^{2+} na ausência da fração como a média \pm E.P.M. (Curva controle, círculo preto, n = 13) # $p < 0,001$, two-way ANOVA, seguido de Holm-Sidak, em comparação com o controle.

5.2.5 Efeito de FAE na CCE induzida por KCl em traqueias isoladas de ratos desafiados ao antígeno sensibilizante

Em tecidos traqueais obtidos de animais pertencentes aos grupos I, II e III foram adicionadas concentrações cumulativas de KCl (10 – 140 mM). As respostas contráteis foram avaliadas 12 h após o desafio com a ovalbumina.

Na Figura 49 (pág. 99) pode-se observar que as respostas contráteis ao KCl em anéis de traqueia de animais desafiados à OVA (Grupo II) foram significativamente superiores ($1,23 \pm 0,17$ g) àquelas obtidas em anéis de traqueia de animais apenas sensibilizados ao antígeno (Grupo I, $0,84 \pm 0,10$ g). Esses valores foram estatisticamente diferentes a partir da concentração de 60 mM de KCl ($p < 0,001$, Two way, seguido de Holm Sidak, $n = 6-12$).

Anéis de traqueia de animais desafiados à OVA e pré-tratados com FAE (Grupo III) não apresentaram hiperreatividade ao KCl, uma vez que foram capazes de inibir as contrações induzidas por este agente. Tecidos provenientes desse grupo de animais apresentaram um valor de contração máxima correspondente a $0,94 \pm 0,007$ g, significativamente inferior àquele apresentado por animais desafiados à OVA (Grupo II). Esses valores foram estatisticamente diferentes a partir da concentração de 60 mM de KCl ($p < 0,001$, Two way, seguido de Holm Sidak, $n = 7-6$). Além disso, verificou-se que as CCE para o KCl de animais do Grupo I e Grupo III não se diferenciaram estatisticamente ($p > 0,05$, Two way, seguido de Holm Sidak, $n = 12-7$).

Figura 49 - Curvas concentração-efeito ao KCl em traqueias isoladas de ratos sensibilizados, desafiados e desafiados pré-tratados com FAE

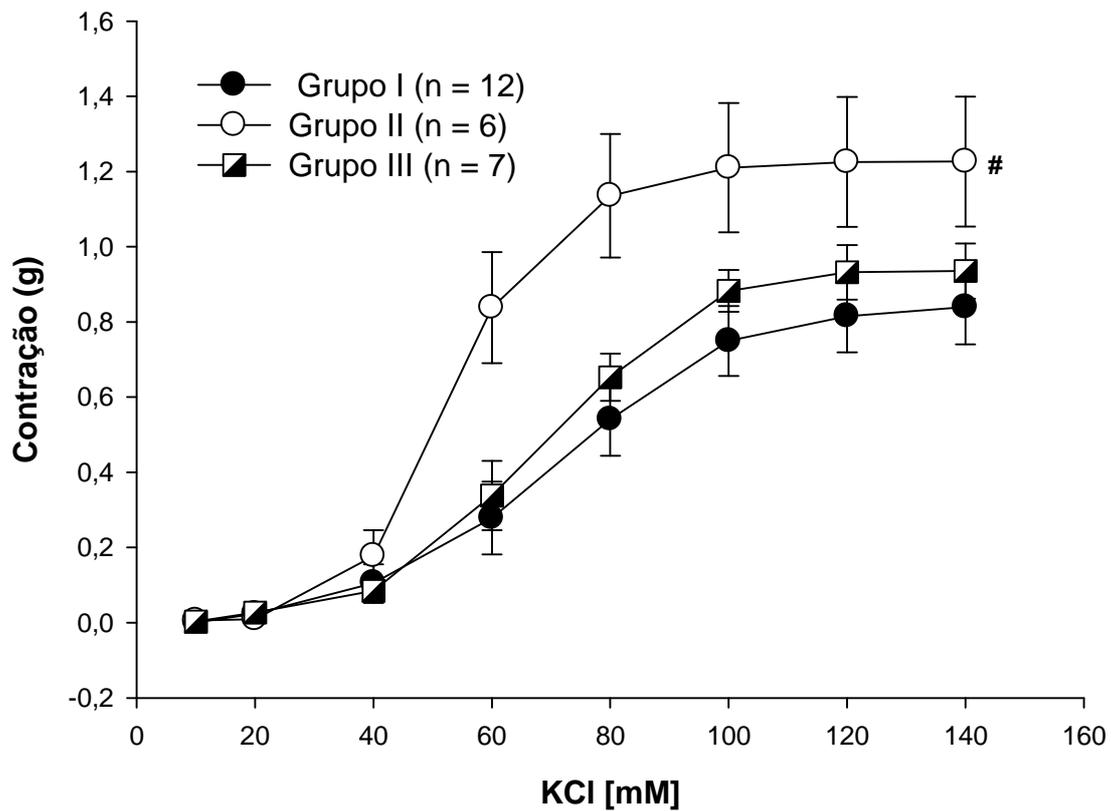


Gráfico que representa o efeito do pré-tratamento com FAE (150 mg/Kg v.o) em animais desafiados pela OVA na CCE induzida por KCl (10 – 140 mM). Grupo I (animais sensibilizados ao antígeno e desafiados com salina, n = 12), Grupo II (animais sensibilizados e desafiados ao antígeno, n = 6) e Grupo III (animais pré-tratados via oral com 150 mg/Kg de FAE e desafiados ao antígeno, n = 7). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. O símbolo # representa a diferença significativa $p < 0,05$ (two-way ANOVA, Holm-Sidak)

5.2.6 Efeito de FAE na migração de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de ratos desafiados à ovalbumina

Na Figura 50 (pág. 101) pode-se observar a análise dos efeitos de FAE na migração de células inflamatórias nas vias aéreas de ratos. Os animais submetidos ao desafio antigênico apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$, teste t) na quantidade de células totais [Grupo II: $2,28 \pm 0,09$ ($\times 10^3$ células / mm^3 ; $n = 5$)] presentes no LBA em relação ao grupo de animais sensibilizados [Grupo I: $0,93 \pm 0,20$ ($\times 10^3$ células / mm^3 ; $n = 5$)]. A Figura 51 (pág. 102) mostra que esse aumento do número de células foi produzido principalmente pela presença de neutrófilos [(Grupo II: $0,50 \pm 0,1$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] e eosinófilos [(Grupo II: $0,09 \pm 0,005$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] cujos incrementos no LBA foram da ordem de 1035% e 533%, respectivamente, dos valores encontrados no LBA de animais apenas sensibilizados ao antígeno [Grupo I - Nt: $0,05 \pm 0,02$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 6$); Eo: $0,02 \pm 0,007$, ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 6$)]. Macrófagos [(Grupo II: $0,78 \pm 0,12$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] e linfócitos [(Grupo II: $0,91 \pm 0,13$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] produziram incremento no LBA de animais desafiados na ordem de 280% e 155%, respectivamente, dos valores encontrados no grupo dos animais sensibilizados [(Grupo I - Mg: $0,28 \pm 0,02$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 6$); Lf: $0,59 \pm 0,01$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 6$)]. Os valores encontrados para o grupo dos animais desafiados com antígeno foram significativamente maiores do que aqueles encontrados para os animais desafiados com salina ($p < 0,05$, teste Rank Sun $n = 7-6$).

O pré-tratamento dos animais com FAE na dose de 150 mg/Kg por via oral reduziu significativamente ($p < 0,001$, teste t) o número de células no LBA de $2,28 \pm 0,09$ ($\times 10^3$ células / mm^3 ; $n = 5$) para $1,08 \pm 0,11$ ($\times 10^3$ células / mm^3 ; $n = 5$) nos animais que sofreram o desafio antigênico. Além disso, pode-se evidenciar que não houve diferença significativa ($p = 0,55$, teste t) entre o grupo de animais que apenas foi sensibilizado ao antígeno e o grupo de animais que foi desafiado ao antígeno e pré-tratado com FAE. Na contagem diferencial do LBA proveniente de animais desafiados pré-tratados com FAE foi possível perceber uma redução significativa ($p < 0,05$, teste Rank Sun) na quantidade de todos os tipos de células avaliadas nesse protocolo quando comparada com a contagem diferencial do LBA de animais desafiados. Essa redução, representada na Figura 51 (pág. 103), foi maior para eosinófilos [(Grupo III: $0,02 \pm 0,003$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] e neutrófilos [(Grupo III: $0,12 \pm 0,05$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$)]. Macrófagos [(Grupo III: $0,45 \pm 0,06$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] e linfócitos [(Grupo III: $0,49 \pm 0,05$ ($\times 10^3$ células / mm^3 , $n = 7$))] também contribuíram para redução do número de células no LBA.

Figura 50 - Efeito do pré-tratamento com FAE na resposta migratória de células inflamatórias em ratos desafiados à ovalbumina

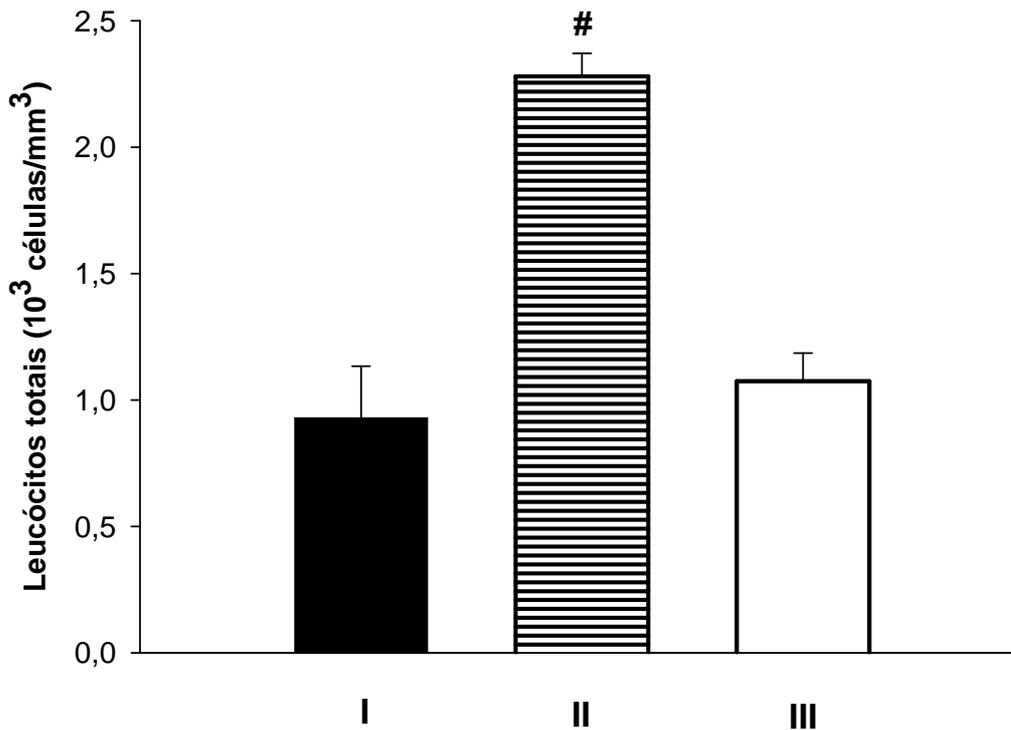


Gráfico que representa o efeito do pré-tratamento via oral com FAE (150 mg/kg) na resposta migratória de células inflamatórias em ratos desafiados à Ovalbumina. Grupo I (animais sensibilizados ao antígeno e desafiados com salina, n = 5), Grupo II (animais sensibilizados e desafiados ao antígeno, n = 5) e Grupo III (animais pré-tratados via oral com 150 mg/Kg de FAE e desafiados ao antígeno, n = 5). Os dados são expressos em média \pm E.P.M. O símbolo # representa significância $p < 0,001$, teste t.

Figura 51 - Efeito do pré-tratamento com FAE em animais desafiados à OVA sobre a contagem diferencial de células (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos) presentes no LBA de ratos.

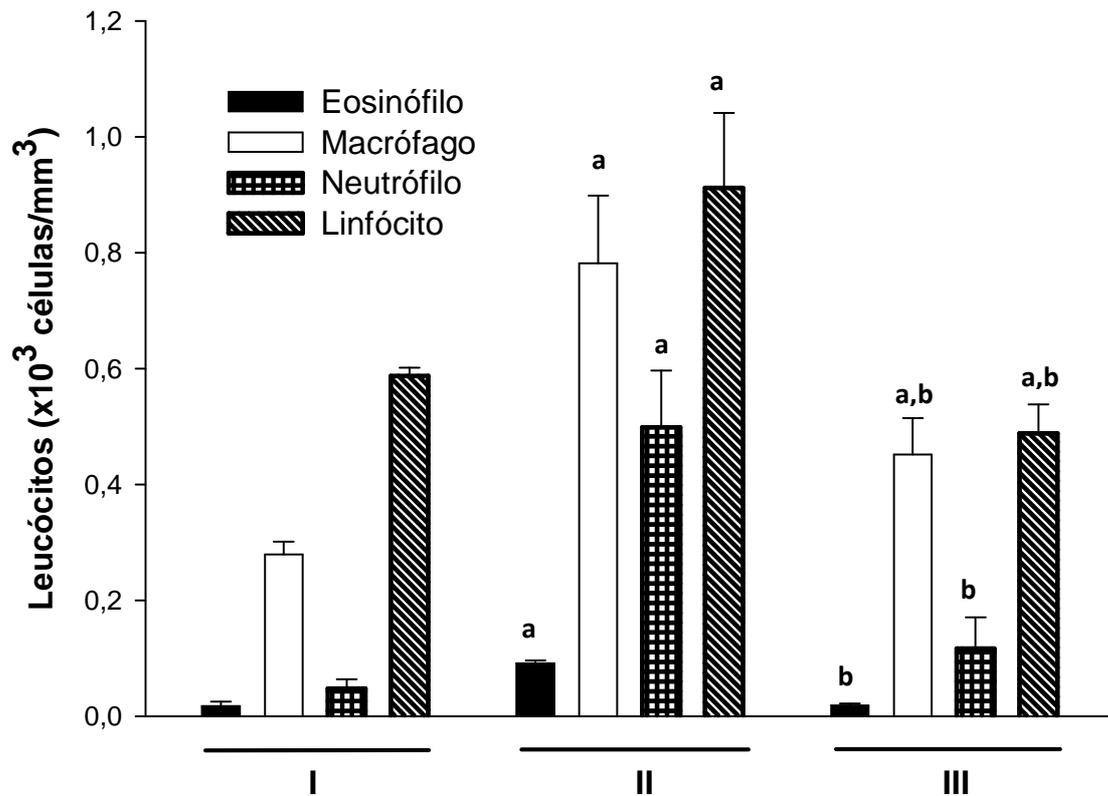


Gráfico que representa o efeito do pré-tratamento com FAE (150 mg/kg v.o) em animais desafiados à OVA sobre a contagem diferencial de células no LBA. Grupo I (animais sensibilizados ao antígeno e desafiados com salina, n = 6), Grupo II (animais sensibilizados e desafiados ao antígeno, n = 7) e Grupo III (animais pré-tratados via oral com 150 mg/Kg de FAE e desafiados ao antígeno, n = 7). Os dados são expressos em média ± E.P.M. ^a p < 0,05 em relação ao grupo sensibilizado à ovalbumina (teste Rank Sun), ^b p < 0,05 em relação ao grupo desafiado ao antígeno (teste Rank Sun).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Hymenaea courbaril L.(Caesalpinoideae) é mais conhecida popularmente no Nordeste como “Jatobá”. Suas folhas, raízes e, principalmente, as cascas do caule são utilizados, tradicionalmente na medicina popular, em diversos tipos de preparações farmacêuticas como infusões, decocções e lambedores para o tratamento de doenças das vias respiratórias, tais como a asma (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010, VIEIRA, 2011). O presente estudo farmacológico demonstrou as ações miorelaxantes e antiespasmódicas de *Hymenaea courbaril* em tecidos isolados de traqueia de ratos, a sua capacidade em inibir a hiperreatividade em tecidos submetidos ao desafio antigênico, bem como atribuiu importantes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes a essa planta. A investigação fitoquímica foi guiada pela atividade miorelaxante do extrato das cascas do caule, bem como das frações obtidas do seu tratamento cromatográfico. Os resultados obtidos dos experimentos realizados nesse trabalho mostraram, de maneira inédita, que extrato, frações e astilbina, substância química isolada dessa espécie vegetal, apresentaram efeito interessante sobre a musculatura lisa traqueal de ratos, sendo o primeiro estudo que relata os efeitos de *H. courbaril* no trato respiratório, corroborando as evidências demonstradas em diversos estudos etnofarmacológicos e justificando o uso dessa espécie na medicina popular.

A composição química das plantas é extremamente complexa, ocorrendo com frequência o isolamento de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, farmacologicamente ativos ou não. Dessa maneira, para a obtenção do extrato vegetal, empregou-se etanol como solvente extrator, uma vez que este é capaz de extrair heterosídeos e agliconas em geral presentes na planta. Além disso, selecionou-se a remaceração como método extrativo, onde há a renovação do líquido extrator para proporcionar o esgotamento da matéria-prima vegetal. Para a obtenção de frações de menor complexidade química e enriquecidas de determinadas substâncias, prosseguiu-se com o tratamento cromatográfico do extrato etanólico obtido, utilizando-se solventes de polaridades crescentes (SIMÕES *et al.*, 2004).

Além da identificação de flavonóides e triterpenos, posteriormente confirmados com o isolamento de astilbina e ácido oleanólico, respectivamente, curiosamente, a abordagem fitoquímica revelou teste positivo para digitálicos, através do teste de *Kedde*, que utiliza um derivado nitrato em meio alcalino para identificar as geninas, estruturas presentes nos

heterosídeos cardiotônicos. Todavia, outros compostos podem apresentar estruturas esteroidais semelhantes à genina e resultarem em teste falso-positivo. Adicionado a isso, até o presente momento não foram encontrados na literatura relatos sobre a presença dessa classe de substâncias na espécie *H. courbaril*, bem como também não são relatados casos de toxicidade devido ao uso dessa planta (SIMÕES *et al.*, 2004; MATOS, 2009).

Inicialmente, EEHC e frações foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante através da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura, que ao ser reduzido por agentes antioxidantes, forma o composto difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, causando diminuição nos valores de absorbância. Tanto EEHC quanto suas frações, em especial FAE e FM, apresentaram forte atividade antioxidante, sendo seus efeitos comparáveis àqueles apresentados pelo Trolox, substância utilizada como padrão positivo para tal atividade. Visto que EEHC apresentou o menor valor de CI_{50} pode-se sugerir que deve ocorrer sinergismo de ação entre as substâncias presentes nas frações e as outras, presentes no extrato. Esses resultados corroboram com os resultados anteriormente obtidos por Aguiar (2009), que realizou o mesmo ensaio para avaliação do potencial antioxidante dos extratos em hexano, em acetato de etila e em metanol das cascas dos frutos de *Hymenaea courbaril*, observando melhor atividade para o extrato metanólico.

Conhecendo o mecanismo de ação de redução de moléculas de DPPH, bem como as principais classes químicas presentes em *H. courbaril*, pode-se sugerir também que a ação antioxidante apresentada pode estar, pelo menos em parte, relacionada à presença de compostos com hidroxilas fenólicas disponíveis na planta, assim como a astilbina, isolada de FAE (MENSOR *et al.*, 2001). No entanto, a atividade antioxidante que é geralmente associada à presença desses compostos fenólicos, também pode ser atribuída à presença de outras substâncias químicas como os triterpenóides, a exemplo disso destacam-se os diversos estudos que relatam o potencial antioxidante do triterpeno ácido oleanólico, também isolado de FAE (SOMOVA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010).

Eosinófilos, neutrófilos e monócitos de sangue periférico, assim como leucócitos de vias aéreas de pacientes asmáticos liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, principalmente durante os períodos de exacerbação da doença (CHANEZ, *et al.*, 1990; KANAZAWA *et al.*, 1991; VACHIER *et al.*, 1992; JARJOUR; BUSSE; CALHOUN, 1992). Esse potencial antioxidante atribuído a *H. courbaril* é um achado importante, uma vez que o aumento desses radicais livres tem sido associado à hiperresponsividade das vias aéreas observadas no processo asmático.

Posteriormente, verificou-se o potencial miorrelaxante de *H. courbaril*, em que foi possível observar a capacidade de EEHC em reverter parcialmente as contrações induzidas por CCh ou KCl na musculatura lisa traqueal de ratos, apresentando relaxamento máximo de aproximadamente 50%. As frações também foram submetidas ao mesmo ensaio, sendo FAE a mais eficaz, revertendo completamente as contrações induzidas por esses agentes, com valores de relaxamento máximo de $95,2 \pm 2,9\%$ na contração induzida por CCh e $100 \pm 4,1\%$, na contração induzida por KCl.

Os efeitos miorrelaxantes da fração bioativa, FAE, mostraram ação em ambos os acoplamentos, eletro- e farmacomecânico, sugerindo que existem diferentes mecanismos de ação envolvidos na atividade apresentada por ela. O carbacol age ligando-se a receptores específicos, ROCs, acoplados à proteína G, desencadeando uma série de eventos intracelulares que culminam com a ligação de segundos mensageiros a receptores específicos na membrana do retículo sarcoplasmático, resultando na liberação de Ca^{2+} para o citosol (SOMLYO *et al.*, 1999; WEBB, 2003). Visto que FAE foi capaz de reverter a contração induzida por este agente contraturante, sugere-se que esta fração age, pelo menos em parte, interferindo na ativação de canais de cálcio operados por receptor. Por outro lado, a adição de K^+ ao meio contendo anéis de traqueia induz um acoplamento eletromecânico através de um aumento na concentração do Ca^{2+} citoplasmático, a partir do influxo desse íon presente no meio extracelular, por meio da ativação de VOCs, canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (FOSTER, SMALL, WESTON, 1983). O efeito miorrelaxante observado no protocolo em que se utilizou KCl como agente contraturante permite sugerir que FAE age, também, interferindo na abertura desses canais. Além disso, foi possível observar pelos valores de CI_{50} , que FAE se mostrou mais potente em reverter a resposta contrátil induzida por KCl, do que aquela induzida por CCh, revelando uma possível ação preferencial sob a resposta contrátil induzida eletromecanicamente.

As alterações provocadas pela adição de EEHC ao banho contendo anéis de traqueia foram reversíveis, uma vez que a adição de K^+ ao final dos experimentos produziu uma resposta contrátil que não se diferenciou estatisticamente da contração obtida inicialmente pelo mesmo agente contraturante. Por outro lado, após a exposição de FAE, a adição de alta concentração de K^+ (60 mM) ao final dos experimentos produziu uma resposta contrátil significativamente menor quando comparada à contração produzida inicialmente, revelando que o efeito da concentração máxima utilizada de FAE (1000 $\mu\text{g/mL}$) na contratilidade do músculo liso traqueal de ratos foi irreversível, considerando-se o intervalo de tempo (30 min) dado para a observação da recuperação do tecido. Essa diferença de ação e potencial

miorrelaxante sobre anéis traqueais isolados de ratos apresentada pelo extrato e suas frações, em especial FAE, pode está relacionada à diferença de concentração das substâncias com potencial para agir sobre canais do tipo VOC presentes no extrato e na fração, uma vez que FAE possivelmente apresenta uma ação inibitória preferencial na resposta contrátil induzida por meios eletromecânicos.

Para avaliar a ação de FAE no acoplamento farmacomecânico, foi analisado o efeito desta fração no influxo de Ca^{2+} através dos canais do tipo ROC. Para isso, foram realizados experimentos na presença de verapamil, bloqueador de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, retirando a influência de canais do tipo VOC, de ACh, que ativa canais do tipo ROC, além de EGTA, em meio fisiológico isento de cálcio. FAE, na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, não foi capaz de inibir as contrações nas condições citadas acima, reduzindo a contração produzida pela adição cumulativa de Ca^{2+} somente na maior concentração utilizada experimentalmente, 600 $\mu\text{g/mL}$, exibindo, assim, capacidade limitada em inibir as contrações induzidas pelo influxo transmembrana de cálcio através de canais de cálcio operados por receptor.

Posteriormente, para avaliar a ação de FAE no acoplamento eletromecânico, analisou-se o efeito desta fração no influxo de Ba^{2+} através dos canais do tipo VOC, visto que este íon apresenta uma seletividade em atravessar a membrana através dos VOCs, sendo pouco permeável em canais do tipo ROC (CUTHBERT *et al.*, 1994; MURRAY; KOTLIKOFF, 1991). Diferente do resultado apresentado no protocolo anterior, FAE foi capaz de inibir as contrações nessas condições experimentais logo na menor concentração utilizada, 300 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, FAE, na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, reduziu as contrações induzidas pela adição cumulativa de Ba^{2+} em aproximadamente 72%, de maneira semelhante ao verapamil (10 μM), bloqueador de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L, que reduziu a resposta contrátil ao Ba^{2+} em aproximadamente 88% (TOWART; SCHRAMM, 1984). Dessa maneira, pode-se sugerir que a maior parte da atividade antiespasmódica dessa fração seja mediada pela diminuição do influxo de Ca^{2+} através dos VOCs, envolvendo uma ação preferencial nas respostas contráteis iniciadas por acoplamento eletromecânico.

No processo asmático, ocorre um aumento na expressão de componentes inflamatórios, caracterizado por hiperresponsividade bronquial, resultante da capacidade das vias aéreas em responder excessivamente a estímulos específicos e inespecíficos (EPSTEIN, 2004). Uma vez que *H. courbaril* tem sido usada tradicionalmente para o tratamento de afecções respiratórias tais como a asma, o presente estudo empregou protocolo experimental que mimetiza o processo asmático num modelo em que a ovalbumina é o antígeno que desencadeia a sensibilização. O procedimento de broncoprovocação pela repetição da

exposição do animal sensibilizado ao antígeno por inalação corresponde a um modelo de asma precoce, sendo caracterizada pelo desencadeamento da resposta broncoconstritora após a reapresentação ao antígeno (ELWOOD, *et al.*, 1991).

Na execução desse protocolo foi possível observar a hiperresponsividade das vias aéreas como consequência da provocação antigênica, uma vez que as respostas contráteis ao KCl em anéis de traqueia de animais desafiados à OVA foram significativamente superiores às aquelas obtidas em anéis de traqueia de animais sensibilizados ao antígeno e desafiados com salina. Esses dados corroboram os achados por Moura (2004) que demonstram, em ratos, que a hiperresponsividade induzida pela sensibilização e desafio antigênico leva a um aumento na responsividade contrátil em resposta à entrada de cálcio extracelular, através de uma alteração da permeabilidade de canais iônicos, VOC ou ROC, sendo este efeito mais evidenciado na resposta contrátil induzida eletromecanicamente. (MOURA *et al.*, 2005).

No presente estudo, o pré-tratamento via oral de animais com 150 mg/Kg de FAE, sendo estes em seguida, desafiados à OVA, foi capaz de reduzir de maneira significativa as contrações traqueais induzidas por K^+ . Além disso, as curvas concentração-efeito obtidas pela adição de K^+ de anéis traqueais de animais desafiados pré-tratados com a fração e de animais apenas sensibilizados apresentaram amplitudes semelhantes, que não se diferenciaram estatisticamente. Dessa maneira, pode-se sugerir que FAE foi capaz de prevenir a hiperresponsividade das vias aéreas de animais que estavam sob processo asmático.

Em modelos experimentais que mimetizam o processo asmático, ratos desenvolvem uma síndrome clínica que se assemelha à asma alérgica, caracterizada principalmente por inflamação eosinofílica pulmonar (EPSTEIN, 2004). Peták *et al.* (2010) em estudo que avaliou o influxo de células para o lavado broncoalveolar de ratos expostos a diferentes tipos de desafio antigênico com ovalbumina, demonstraram que inalações repetidas de OVA após a injeção intraperitoneal do alérgeno induz um influxo de células inflamatórias, especialmente eosinófilos, no lavado broncoalveolar. Diversos estudos clínicos tem mostrado que as exacerbações agudas da asma grave estão associadas ao recrutamento e ativação de neutrófilos nas vias aéreas (LINDÉN, 2001). Dessa maneira, foi considerado importante investigar o efeito de FAE nos eventos inflamatórios evocados pela provocação com ovalbumina, através da análise do conteúdo celular no lavado broncoalveolar.

No presente estudo, os animais desafiados ao antígeno apresentaram um incremento no número total de células inflamatórias quando comparados aos animais apenas sensibilizados ao antígeno. Esse efeito foi produzido, principalmente, pelo aumento no número de neutrófilos e eosinófilos na contagem diferencial. Por outro lado, o pré-tratamento

por via oral com FAE de animais desafiados ao antígeno reduziu significativamente a quantidade de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar quando comparado ao grupo de animais que sofreu o desafio antigênico, indicando que esta fração além de possuir atividade miorrelaxante e antiespasmódica, também inibe a migração de células inflamatórias nas vias aéreas em modelo experimental que mimetiza o processo asmático. Essa redução na quantidade de células no LBA para valores que não se diferenciaram estatisticamente daqueles observados no grupo de animais sensibilizados ao antígeno se deu, principalmente, pela diminuição no número de eosinófilos e neutrófilos. Uma vez que a inflamação pode induzir alterações no aparelho contrátil, contribuindo para o aparecimento de hiperresponsividade das vias aéreas, a análise em conjunto dos resultados obtidos com os protocolos que mimetizaram o processo asmático, permite sugerir que FAE, usada previamente no tratamento *in vivo*, possui potencial efeito anti-inflamatório (FERNANDES *et al.*, 2003).

Neutrófilos podem liberar fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória que se encontra aumentada em vias aéreas asmáticas e é capaz de causar hiperresponsividade brônquica (LINDÉN, 2001). Enquanto que eosinófilos migram através do endotélio vascular, aderem no epitélio das vias aéreas, e liberam produtos tóxicos tais como a peroxidase eosinofílica, que podem causar dano epitelial (BUSSE; SEDGWICK, 1992, MAUAD *et al.*, 2000). Conforme mencionado anteriormente, as características fundamentais de asma brônquica incluem eosinofilia tecidual e esse mecanismo de recrutamento celular parece está sob a regulação de citocinas que são derivadas de linfócitos do tipo T (DURHAM; TILL; CORRIGAN, 2000). Já os macrófagos parecem estar inadequadamente ativados durante o processo asmático e tem como resposta celular a liberação de citocinas, elastase e metaloproteases, que podem degradar os componentes da matriz extracelular (MAUAD *et al.*, 2000, MOREIRA; HOGABOAM, 2011).

A possibilidade de que o tratamento via oral com FAE seja potencialmente capaz de prevenir a inflamação alérgica nas vias respiratórias através da inibição da do recrutamento de células inflamatórias para as vias aéreas e, por consequência, reduzir a liberação de oxidantes e outros mediadores inflamatórios é particularmente interessante para o tratamento de doenças inflamatórias das vias respiratórias, contudo são necessários ensaios que demonstrem como se dá a ação de FAE na produção e liberação desses agentes inflamatórios.

Alguns estudos tem demonstrado o potencial miorrelaxante e antiasmático de flavonóides. Leal *et al.* (2006), mostraram que isocampferídeo, um flavonóide presente nas cascas do caule de *Amburana cearensis*, apresenta atividade relaxante sobre traqueia isolada

de cobaias, que parece ser mediada através de canais de potássio sensíveis ao Ca^{2+} e ao ATP. O flavonóide hispidulina, isolado de *Clerodendrum petasites* através de um estudo bioguiado, também apresentou forte atividade broncodilatadora (HAZEKAMP, VERPOORTE, PANTHONG, 2001). Isoliquiritigenina isolada de *Glycyrrhiza glabra* também relaxa anéis traqueais de cobaia através de múltiplas ações intracelulares, incluindo a ativação de guanilatociclase, inibição de fosfodiesterase e ativação da cascata de sinalização da proteína quinase dependente de GMPc (LIU *et al.*, 2008). Quercetina e rutina exibiram suas atividades antiasmáticas inibindo a produção de histamina, fosfolipase A_2 e peroxidase eosinofílica, e o recrutamento de leucócitos, principalmente, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente (JUNG *et al.*, 2007).

Após a investigação dos efeitos de FAE na musculatura lisa traqueal de ratos, dos seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante, foi realizada a avaliação do efeito de astilbina, flavonóide isolado a partir do tratamento cromatográfico desta fração, na contração induzida por alta concentração de KCl, objetivando associar a sua atividade farmacológica com aquela apresentada por FAE e dessa maneira, tentar explicar o potencial terapêutico da planta medicinal ou de suas frações a partir da compreensão das propriedades terapêuticas dos seus constituintes (VASCONCELLOS *et al.*, 2002).

No presente estudo, a adição de concentrações cumulativas de astilbina foi capaz de reverter aproximadamente 50% da contração induzida por K^+ . Esse resultado permite afirmar que astilbina apresenta atividade relaxante sobre músculo liso traqueal de ratos e que esta substância é responsável, pelo menos em parte, pela atividade miorrelaxante apresentada por FAE.

Astilbina foi anteriormente isolada das folhas de *H. courbaril* (ARTAVIA; BARROS; CASTRO, 1995). Em estudo bioguiado realizado por Moulari *et al.* (2006), esse composto foi isolado das folhas de *Harungana madagascariensis* e avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana, apresentando alto potencial antimicrobiano sobre bactérias Gram-negativas (*Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp.) e Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*). Outros estudos evidenciaram que astilbina apresenta atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina e essa atividade não diferiu daquela apresentada pelo captopril, fármaco usado como controle positivo, mostrando seu alto potencial anti-hipertensivo (LUCAS-FILHO *et al.*, 2010).

É válido salientar que a astilbina também foi isolada a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico total do rizoma de *Smilax china* e teve a sua atividade antioxidante avaliada através de modelos *in vitro*, tais como DPPH e óxido nítrico, sendo possível observar

potenciais aplicações desse flavonóide como forte agente antioxidante (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2011).

Huang *et al.* (2011) isolaram esse composto das folhas de *Engelhardia roxburghiana* e demonstram sua atividade anti-inflamatória através dos efeitos inibitórios na expressão de fatores inflamatórios como Interleucinas-1 e 10 e TNF- α , bem como na expressão de RNA mensageiro da enzima COX-2, que promove a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, substâncias que regulam vários processos patofisiológicos, incluindo as reações inflamatórias (SMITH; LANGENBACH, 2001). Novos tratamentos para asma grave são desenvolvidos tendo como alvo citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, a inibição da expressão de TNF- α e como foi citado anteriormente, por exemplo, pode ser um alvo interessante uma vez que este tem a sua expressão aumentada tanto no LBA como no interior das vias aéreas de pacientes com asma grave (HOWARTH *et al.*, 2005) e desempenha um papel importante na indução de HRB (THOMAS; YATES; BARNES, 1995), e na hipersecreção de muco (LEVINE *et al.*, 1995). Dessa maneira, a avaliação farmacológica preliminar de astilbina combinado aos dados etnofarmacológicos sobre o uso de *H. courbaril* faz desse flavonóide um bom candidato a investigações futuras acerca do seu potencial miorrelaxante e anti-inflamatório.

Do tratamento cromatográfico de FAE, obteve-se também ácido oleanólico (HCC-5), que no melhor dos nossos conhecimentos está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Hymenaea*. Todavia, não foi possível verificar a participação do ácido oleanólico nos efeitos miorrelaxantes apresentados pela fração (FAE) devido à pequena quantidade obtida no processo de isolamento. A avaliação do seu potencial miorrelaxante sobre traqueia isolada de ratos constitui um dos objetivos futuros e para esta ocasião foi considerado importante discorrer acerca do seu potencial farmacológico já descrito na literatura.

Uma das importantes propriedades farmacológicas atribuídas ao ácido oleanólico é o seu efeito hepatoprotetor. Tem sido demonstrado que este triterpeno não só é eficaz em proteger o fígado de lesões agudas induzidas quimicamente, mas também o protege de fibrose e cirrose, causada por doenças hepáticas crônicas (LIU, 1995, 2005; REISMAN; ALEKSUNES; KLAASSEN, 2009; WANG *et al.*, 2010). É também relatado que exerce atividade anti-cancerígena e anti-inflamatória (DZUBAK *et al.*, 2006; PETRONELLI; PANNITTERI; TESTA, 2009).

Outros estudos demonstraram atividades biológicas interessantes atribuídas a este composto que podem corroborar os resultados obtidos nos ensaios miorrelaxantes, anti-inflamatórios e antioxidantes apresentados por FAE no presente trabalho. Singh *et al.* (1992)

demonstraram que o ácido oleanólico exibe atividade anti-inflamatória em modelos experimentais *in vivo* tais como edema de pata induzido por carragenina e dextrano, através da redução do volume de exudato e inibição da infiltração de leucócitos para o local da inflamação. Seus efeitos anti-inflamatórios também foram demonstrados através da inibição da degranulação de mastócitos (DAI *et al.*, 1989). Ácido oleanólico também foi capaz de produzir resposta relaxante em anéis de aorta pré-contraídas por fenilefrina (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ; GONZALEZ; RUIZ-GUTIMVEZ, 2004), além dos inúmeros estudos que comprovam o seu potencial antioxidante já citados anteriormente (SOMOVA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010). Esse triterpenóide apresentou importante atividade antiasmática em modelo experimental de asma com cobaias através da diminuição da resistência ao fluxo aéreo, bem como pela inibição do recrutamento de eosinófilos e liberação de mediadores inflamatórios como histamina, fosfolipase A₂ e peroxidase eosinofílica nos pulmões (LEE; MOON; KIM, 2010).

É particularmente interessante que compostos fenólicos como a astilbina, e triterpenóides como o ácido oleanólico, presentes na fração bioativa de *H. courbaril* combinem efeitos do tipo antioxidante, anti-inflamatório, miorrelaxante e antiasmático, uma vez que o “Jatobá” tem sido usado na medicina tradicional para o tratamento de afecções respiratórias com envolvimento inflamatório, tais como a asma.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o estudo farmacológico de *H. courbaril* permitiram as seguintes conclusões:

- A abordagem fitoquímica da planta revelou, principalmente, a presença de polifenóis como flavonóides e taninos, bem como antociânicos, triterpenóides e saponinas;
- EEHC, FD, FDAE, FAE e FM apresentaram atividade sequestradora de radicais livres, sendo EEHC a amostra com maior eficácia, revelando a presença de constituintes químicos com alto potencial antioxidante;
- EEHC e frações apresentam efeito miorelaxante sobre traqueia isolada de rato, sendo FAE a mais eficaz em reverter as contrações induzidas por CCh e K^+ ;
- FAE parece agir de maneira preferencial na resposta contrátil induzida por acoplamento eletromecânico e o seu efeito na contratilidade do músculo liso traqueal de ratos foi irreversível, considerando-se a concentração máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e o intervalo de tempo (30 min) dado para a observação da recuperação do tecido;
- O tratamento prévio com FAE de animais desafiados à ovalbumina reduziu a hiperresponsividade das vias aéreas provocada por KCl, bem como reduziu o processo inflamatório através da interferência no processo de migração celular, com a diminuição, em particular, da eosinofilia e neutrofilia;
- Astilbina, isolada de FAE, apresenta atividade relaxante sobre músculo liso traqueal de ratos, sendo responsável, pelo menos em parte, pela atividade miorelaxante apresentada pela fração;
- Ácido oleanólico, pela primeira vez isolado do gênero *Hymenaea*, combina efeitos farmacológicos interessantes descritos na literatura, que tornam essa substância uma boa candidata a investigações futuras em relação aos seus efeitos no trato respiratório.

Os resultados obtidos no presente trabalho forneceram evidências científicas de que *H. courbaril* apresenta potenciais efeitos miorelaxante, anti-inflamatório e antioxidante, se constituindo no passo inicial da investigação do potencial químico e farmacológico dessa espécie, sendo necessários estudos interdisciplinares adicionais para maiores esclarecimentos acerca da natureza química da sua fração bioativa, FAE, bem como do seu mecanismo de ação no trato respiratório.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M.; BERGER, J. M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J. H.; WERKHOVEN, M. C. M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D. G. I. Isolation and absolute configuration of *ent*-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products**, v.65, p.11-15, 2002.
- AGUIAR, J. C. **Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L.** 2009. 139p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Faculdade de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- AGUIAR, J. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LAVOR, P. L.; VERAS, H. N.; FERREIRA, Y. S.; LIMA, M. A.; ARRIAGA, A. M.; LEMOS, T. L.; LIMA, J. Q.; DE JESUS, H. C.; ALVES P. B.; BRAZ-FILHO R. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Natural Product Communication**, v. 5 (12) p. 1977-1980. 2010.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descobertas de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALENCAR, A. L.; SILVA, M. A. P.; BARROS, L. M. Florística e fitossociologia de uma área de cerrado na chapada do Araripe – Crato – CE. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p. 18-20, 2007.
- AN, S. S.; BAI, T. R.; BATES, J. H. T.; BLACK, J. L.; BROWN, R. H.; BRUSASCO, V.; CHITANO, P.; DENG, L.; DOWELL, M.; EIDELMAN, D. H.; FABRY, B.; FAIRBANK, N. J.; FORD, L. E.; FREDBERG, J. J.; GERTHOFFER, W. T.; GILBERT, S. H.; GOSENS, R.; GUNST, S. J.; HALAYKO, A. J.; INGRAM, R. H.; IRVIN, C. G.; JAMES, AL. L.; JANSSEN, L. J.; KING, G. G.; KNIGHT, D. A.; LAUZON, A. M.; LAKSER, O. J.; LUDWIG, M. S.; LUTCHEN, K. R.; MAKSYM, G. N.; MARTIN, J. G.; MAUAD, T.; MCPARLAND, B. E.; MIJAILOVICH, S. M.; MITCHELL, H. W.; MITCHELL, R. W.; MITZNER, W.; MURPH, T. M.; PARE´, P. D.; PELLEGRINO, R.; SANDERSON, M. J.; SCHELLENBERG, R. R.; SEOW, C. Y.; SILVEIRA, P. S. P.; SMITH, P. G.; SOLWAY, J.; STEPHENS, N. L.; STERK, P. J.; STEWART, A. G.; TANG, D. D.; TEPPER, R. S.; TRAN, T.; WANG, L. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 29, p. 834-860, 2007.
- ARTAVIA, D.; BARRIOS, M.; CASTRO, O. A flavanonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves. **Fitoterapia**, v. 66 (1) p. 91-92, 1995.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO – ABIFISA. Suplemento alimentar e de promoção da saúde. Disponível em: Acesso em: <<http://abifisa.org.br/faq.asp#29>>. Acesso em: 29 out. 2012.
- BAI, Y., ZHANG, M., SANDERSON, M. J. Contractility and Ca²⁺ signaling smooth muscle cells in different generations of mouse airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 36, p. 122-130, 2007.
- BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. New chalconoid dimers from *Myracrodruon urundeuva*. **Natural Product Letters**, v. 4 (2), p. 113-120, 1994.

BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. Structural elucidation and total assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of new chalcone dimers. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 41, p. 1009-1014, 2003.

BARNES, P. J. Neural control of human airways in health and disease. **American Review of Respiratory Disease**, v. 134, p. 1289-1314, 1986.

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 515-596, 1998.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BASTOS, V. P. D.; BRITO, T. S.; BATISTA-LIMA, F. J.; PINHO, J. P. M.; LAHLOU, S.; MATOS, F. J. A.; SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. C. Inhibitory effect of 1,8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 36, p. 1120-1126, 2009.

BENNETT, B. C.; PRANCE, G. T. Introduce plants in the indigenous pharmacopeia of Northern South America. **Economic Botany**, v. 54, p. 90-102, 2000.

BERGER, P.; GIRODET, P. O.; BEGUERET, H.; OUSOVA, O.; PERNG, D. W.; MARTHAN, R.; WALLS, A. F.; LARA, J. M. T. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. **FASEB Journal**, v. 17(14), p. 2139-2141, 2003.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, p. 5047-5061, 2008.

BHARADWAJ, A.; AGRAWAL, D. K. Immunomodulation in asthma: a distant dream or a close reality? **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 495-511, 2004.

BRANDY-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 525-531, 2001.

BUSSE, M. M.; LEMANSKE, R. F. Asthma. **The new England Journal of Medicine**, v. 344, p. 350-362, 2001.

BUSSE, W. W.; SEDGWICK, J. B. Eosinophils in asthma. **Annals of Allergy**, v. 68, p. 286-290, 1992.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, M. A. A.; UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 281-288, 2002.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de Amburana cearenses A. C. Smith. **Química Nova**, v.29 (6), p. 1241-1243, 2006.

CARAMORI, G; PAPI, A. Oxidants and asthma. **Thorax**, v. 59 (2), p. 170-173, 2004.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 975-981, 2012.

CHANEZ, J. P.; DENT, G.; YUKAWA, T.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with PAF or phorbol ester. **European Respiratory Journal**, v. 3, p. 1002-1007, 1990.

CHIBA, Y.; MISAWA, M. Strain differences in change in airway responsiveness after repeated antigenic challenge in three strains of rats. **General Pharmacology**, v. 24, p. 1265-1272, 1993.

CLAY, J. W; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 1999. 409p.

COELHO-DE-SOUZA, L. N.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MATOS, F. J. A.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Medica**, v. 71, p. 1173-1175, 2005.

CUNNINGHAM, A., MARTIN, S. S., LANGENHEIM, J. H. Resin acid from two amazon species of *Hymenaea*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 294-295, 1973.

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca²⁺ influx intracellular and Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig tracheal. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 620-627, 1994.

DAI, Y.; HANG, B. Q.; LI, P. Z.; TAN, L. W. Effects of oleanolic acid on immune system and type I allergic reaction. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 10, p. 381-384, 1989.

DURHAM, S. R.; TILL, S. J.; CORRIGAN, C. J. T. Lymphocytes in asthma: Bronchial versus peripheral responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 221-226, 2000.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J.. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 394–411, 2006.

ELWOOD, W.; LOTVALL, J. O.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Characterization of allergen induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 88, p. 951–960, 1991.

EPSTEIN, M. M. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 133, p. 84-100, 2004.

FERNANDES, D. J.; RICHARD, W. M.; LAKSER, O.; DOWELL, M.; STEWART, A. G.; SOLWAY, J. Airway hyperresponsiveness: from molecules to bedside. Invited Review: Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma? **Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 844-853, 2003.

FILHO, J. S. C.; BLANK, M. F. A.; BLANK, A. F.; RANGEL, M. S. A. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **Revista Cerne**, v.9, p. 109-118, 2003.

FOSTER, R. W.; SMALL, R. C.; WESTON, A. H. The espermogenic action of potassium chloride in guinea-pig trachealis. **British Journal of Pharmacology**, v. 80, p. 553-559, 1983.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.3, p. 97-102, 1998.

GUARIM NETO, G.; DE MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta botânica brasílica**, São Paulo, v.17 (4), p.561-584, 2003.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2011, 1128p.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R.; PANTHONG, A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 45–49, 2001.

HOWARTH, P. H.; BABU, K. S.; ARSHAD, H. S.; LAU, L.;BUCKLEY, M.;McCONNELL, W.; BECKETT, P.; AL, A. M.; CHAUHAN, A.; WILSON, S. J.; REYNOLDS, A.; DAVIES, D. E.; HOLGATE, S. T. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. **Thorax**, v. 60 (12), p.1012–1018, 2005.

HUANG, H.; CHENG, Z.; HAIMING, S.; XIN, W.; WANG, T. T. Y.; YU, L. L. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardtia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.4562-4569, 2011.

- HUTSON, P. A.; CHURCH, M. K.; CLAY, T. P.; MILLER, P.; HOLGATE, S. T. Early and late phase bronchoconstriction following allergen challenge of non-anesthetized guinea-pigs: I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration. **American Review of Respiratory Disease**, v. 137, p. 548-57, 1988.
- IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J.; BARATA, L. E. S.; RÚVEDA, E. A. ^{13}C NMR spectral analysis of eperuane diterpenes. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1842- 1844, 1977.
- IMAMURA, P. M.; MIRANDA, P. C. M. L.; GIACOMINI, R. A. A complete ^1H and ^{13}C NMR data assignment for the diterpene methyl (-)-zanzibarate by 2D spectroscopy and NOE experiments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 42, p. 561-563, 2004.
- JARJOUR, N. N.; BUSSE, W. W.; CALHOUN, W. J. Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 146, p. 905-911, 1992.
- JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINO, R. L.; DEWITT, D. L.; NAIR, G. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 105, p. 485-490, 2007.
- JUNG, C. H.; LEE, J. Y.; CHO, C. H.; KIM, C. J. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious Guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30 (12), p.1599-1607, 2007.
- KANAZAWA, H.; KURIHARA, N.; HIRATA, K.; TAKEDA, T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. **Chest**, v. 100, p. 1319-22, 1991.
- KEIJI, T.; KENJI, K.; YOSHIO, K.; TOHRU, M.; ISAO, M. Tyrosinase inhibitors from the pericarp of Jatoba (*Hymenaea courbaril* L.). **Natural Medicines**, v. 53 (1), p. 15-21, 1999.
- KHOO, S. F.; OEHLSCHLAGER, A. C.; OURISSON, G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. **Tetrahedron**, v. 29 (21), p. 3379-3388, 1973.
- KIRKPATRICK, C. T.; JENKINSON, H. A.; CAMERON, A. R. Interaction between drugs and potassium-rich solutions in producing contraction in bovine tracheal smooth muscle: studies in normal and calcium-depleted tissues. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 2, n. 6, p. 559-570, 1975.
- KUMAR, R. K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 91 (2), p.93-104, 2001.
- LANGENHEIM, J. H. Preliminary investigations of *Hymenaea courbaril* as a resin producer. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 48, p. 203-230, 1967.
- LANGE, P.; PARNER, J.; VESTBO, J.; SCHNOHR, P.; JENSEN, G. A. 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 1194-1200, 1998.
- LAW, K. H.; NG, K. K.; YUEN, K. N.; HO, C. S. Detecting asthma and bronchial hyperresponsiveness in children. **Hong Kong Medical Journal**, v. 6, p. 99-104, 2000.

LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K.; FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R. A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical from *Amburana cearensis* A.C.Smith. **Phytotherapy Research**, v. 14 (4), p. 335-340, 2003.

LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M. BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, v. 79, p. 98-104, 2006.

LEAL, L. K. A. M. **Contribuição para a validação do uso medicinal de Amburana cearensis (CUMARU): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo**. 2006. 179p. Tese (Doutorado em Farmacologia.). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

LEE, Y. T.; LANGENHEIM, J. H. Systematics of the genus *Hymenaea* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany**, 1975. 109p.

LEE, J. Y.; MOON, H.; KIM, C. J. Effects of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids from *Forsythia viridissima* on Asthmatic Responses to Ovalbumin Challenge in Conscious Guinea Pigs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33 (2), p. 230-237, 2010.

LEITE, J. P. V. Desenvolvimento da fitoterapia. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 328p.

LEVINE, S. J.; LARIVÉE, P.; LOGUN, C.; ANGUS, C. W.; OGNIBENE, F. P.; SHELHAMER, J. H. Tumor necrosis factor- α induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 12, p. 196–204, 1995.

LIMA, A. F.; AZEVEDO, K. S.; CAMPOS, C. A. S.; TAVEIRO, U. S.; ROCHA, A. A. Manejo da seiva do jatobá por famílias tradicionais na reserva extrativista Chico Mendes, Acre. In: Congresso de Ecologia do Brasil. 9, 2007, Caxambu. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007, p. 1-3.

LINDÉN, A. Role of Interleukin-17 and the Neutrophil in Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 126, p.179–184, 2001.

LIU, B.; YANG, J.; WEN, Q.; LI, Y. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro and in vivo: Role of cGMP/PKG pathway. **European Journal of Pharmacology**, v.587, p. 257–266, 2008.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57–68, 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92–94, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – Manual de identificação de cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v.1. Ed: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 1992, 384p.

- LUCAS-FILHO, M. D.; SILVA, G. C.; CORTES, S. F.; MARES-GUIA, T. R.; PÉRPETUA FERRAZ, V.; SERRA, C. P.; BRAGA, F. C. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. **Phytochemistry**, v.17, p. 383-387, 2010.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGAJR, V. F.; GRYNBERG, N. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v. 37, (6), p. 1517-1575, 1994.
- MARSAIOLI, A. J.; FILHO, H. F. L.; CAMPELLO, J. P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v.14, p. 1882-1883, 1975.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 150p., 2009.
- MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais-guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 3ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária/Edições UFC, 2007.
- MAUAD, T.; SOUZA, S. L.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. **Jornal de Pneumologia**, vol.26 (2), p. 91-98, 2000.
- MASINI, E.; VANNACCI, A.; GIANNINI, L.; BEFANI, O.; NISTRI, S.; MATEESCU, M. A.; MANNAIONI, P. F.; MONDOVI, B.; FEDERICO, R. Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. **European Journal of Pharmacology**, v.502(3), p. 253-264, 2004.
- MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha grande RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 55-58, 2003.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; dos SANTOS, T. C., COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15 (2), p.127-130, 2001.
- MOREIRA, A. P.; HOGABOAM, C. M. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31(6), p. 485-91, 2011.
- MOULARI, B.; PELLEQUER, Y.; LBOUTOUNNE, H.; GIRARD, C.; CHAUMONT, J.-P.; MILLET, J.; MUYARD, F. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex Poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 272-278, 2006.
- MOURA, C. T. M., **Participação dos canais iônicos na hiperreatividade induzida por ovalbumina em traqueias isoladas de ratos**, 2004. 122p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- MOURA, C. T.; BEZERRA, F. C.; DE MORAES, I. M.; MAGALHÃES, P. J. C.; CAPAZ, F. R. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited

by nifedipine and niflumic acid in rat trachea in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.32, p.1119–1123, 2005.

MURRAY, R. K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. **Journal of Physiology**, v. 435, p. 123-144, 1991.

NAKANO, T.; DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 26, p. 167-173, 1961.

NOGUEIRA, R. T.; SHEPHERD, G. J.; LAVERDE, J. R. A.; MARSAIOLI, A. J. IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v.58, p. 1153-1157, 2001.

NOGUEIRA, R T.; GIACOMINI, R. A.; SHEPHERD, G. J.; IMAMURA, P. M. A new *ent*-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altíssima*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13 (3), p. 389-391, 2002.

OMAIRA, A.; GLADYS, L. P.; MARITZA, M.; OMAIRA, G.; LILIAN, S.; Structural features of a xylogalactan isolated from *Hymenaea courbaril* gum. **Food Hydrocolloid**, v.21 (8), p. 1302-1309, 2007.

PAREKH, A. B., PUTNEY, J. W. JR. Store-operated calcium channels. **Physiological Reviews**. v.85, p. 757-810, 2005.

PEAT, J. K., WOOLCOCK, A. J., CULLEN K. Rate of decline of lung function in subjects with asthma. **European journal of respiratory diseases**, v. 70, p. 171-179, 1987.

PENDRY, Y. D. Neuronal control of airways smooth muscle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, p. 171-202, 1993.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; KARNER, C.; ITO, S; SHEPHERD, M.; ALRASHDAN, Y.; SANDERSON, M. J. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22 (5), p. 388-397, 2009.

PETÁK, F., BÁNFI, A., TÓTH-SZÜKIC, V.; BARÁTI, L.; BARI, F.; SZÉKELY, E.; NOVÁK, Z. Airway responsiveness and bronchoalveolar lavage fluid profiling in individual rats: Effects of different ovalbumin exposures. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 170, p. 76–82, 2010.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, p. 880–892, 2009.

PINTO, A. C.; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazonica**, v.33, (2), p.281-290, 2003.

PRETOLANI, M.; RUFFIE, C.; JOSEPH, D.; CAMPOS, M. G.; CHURCH, M. K.; LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B. Role of eosinophil activation in the bronchial reactivity of allergic guinea pig. **American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine**, v. 149, p. 1167-1174, 1994.

PUTNEY, J. W., McKAY, R. R. Capacitative calcium entry channels. **BioEssays**, v. 21, p. 38-46, 1999.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. Manual de Dendrologia Brasileira. Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 1971. 294p.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; GONZALEZ, M. H; RUIZ-GUTIMVEZ, V. Beneficial vascular effects of oleanolic acid and erythrodiol. **Atherosclerosis Supplements**, v.5 (1), p.147-147, 2004.

REISMAN, S.A.; ALEKSUNES, L.M.; KLAASSEN, C.D. Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 1273–1282, 2009.

SALVADOR, J. L. G. **Considerações sobre as matas ciliares e a implantação de reflorestamentos mistos nas margens de rios e reservatórios**. Ed. CESP: São Paulo, 1989. 15p.

SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, M. A.; FARESin, S. M.; SANTORO, I. L.; FERNANDES, A. L. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40 (7), p.943-948, 2007.

SBPT. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisologia para o manejo da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.38, p.1-46, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, 2004. 1103p.

SIMÕES, K., DU, J.; PESSONI, R. A. B.; CARDOSO-LOPES, E. M.; VIVANCO, J. M.; STERMITZ, F. R.; BRAGA, M. R. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry Letters**, v.2 (2), p. 59-62, 2009.

SINGH, G. B.; SINGH, S.; BANI, S.; GUPTA, B. D.; BANERJEE, S. K. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, p. 456–45, 1992.

SMITH, W. L.; LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **Journal of Clinical Investigation**, v.107, p. 1491-1495, 2001.

SOMOVA, L. O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F. O. Cardiovascular, antihyperlipidemic effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, p. 115-121, 2003.

SOMLYO, A. P; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: The role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatase. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 134, p. 201-234, 1999.

SOUSA, M. S.; BEZERRA, G. P.; LEAL, J. K. F.; CARVALHO, J. L.; ROMERO, N. R.; BEZERRA, F. S. M. Molluscicidal activity of *Hymenaea courbaril* L. against *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. In.: International Congress on Medical and Applied Malacology, 9., 2012. Rio de Janeiro. **Anais do XI International Congress on**

Medical and Applied Malacology: Crossing Boundaries: Integrative Approaches to Malacology, 2012, p. 196.

SOUZA, S. M.; AQUINO, L. C. M.; MILACH, A. C.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. **Phytotherapy Research**, v.21, p. 220-225, 2007.

SOUZA, G. E.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17 (1), p.97-103, 1985.

STEPHENS, N. L. Airway smooth muscle. **Lung**, v.179, p. 333-373, 2002.

THOMAS, P. S.; YATES, D. H.; BARNES, P. J. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.152, p. 76– 80, 1995.

TOWART, R.; SCHRAMM, M. Recent advances in the pharmacology in the calcium channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 5, p. 111-113, 1984.

VACHIER, I.; DAMON, M.; LE DOUCEN, C., DE PAULET, A. C.; CHANEZ, P.; MICHEL, F. B.; GODARD, P. Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. **The American Review of Respiratory Disease**, v.146, p.1161-1166, 1992.

VAN OOSTERHOUT, A. J. M.; LANDENIUS, A. R. C.; SVELKOU, H. F. J.; VAN ARK, I.; DESLMAN, K. C.; NIJKAMP, F. P. Effect of anti-IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pig. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 147, p. 548-552, 1993.

VASCONCELLOS, A. G.; BRANQUINHO, F. B.; SANCHES, C.; LAGE, C. L. S. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: O reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 105-110, 2002.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES S, M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 361-372, 2005.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MOURA, L. C.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; MATOS, F. J. A.; RIBEIRO, R. A. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 118-122, 1997.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, A. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189-195, 2003.

VIEIRA, V. M. S. F. **Etnobotânica de plantas medicinais comercializadas em mercados públicos do Nordeste Brasileiro**, 2011. 118p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

VIJAYALAKSHMI, A.; RAVICHANDIRAN, V.; JAYAKUMARI, S.; VELRAJ, M. Antioxidant and anticonvulsant activity of astilbin, a flavonoid glycoside from the rhizome of *Smilax china* Linn. **Journal of Pharmacy Research**, v.4 (3), p. 561, 2011.

VILLAS BOAS, G. K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23 (6) p. 1463-1471, 2007.

WANG, X.; YE, X.; LIU, R.; CHEN, H.; BAI, H.; LIANG, X.; ZHANG, X.; WANG, Z.; LI, W.; HAI, C. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, p. 328-337, 2010.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27 p. 201-206, 2003.

ANEXO**DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

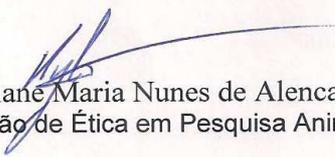
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 37/2012, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DAS FOLHAS E DA CASCA DO CAULE DE HYMENAEA COURBARIL L.”**, de responsabilidade de Gabrieli da Penha Bezerra e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Fortaleza, 11 de setembro de 2012


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA