

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIHISTAMÍNICA DA *KALANCHOE BRASILIENSIS*

STUDY OF ANTIHISTAMINE ACTIVITY OF *KALANCHOE BRASILIENSIS*

Carlos César Scala de Almeida *
 Fernanda Bassit Bogossian *
 Ana Paula Kyono Doi *
 Daniela Isoyama *
 Giok Ho Sih *
 Walter Regattieri Zanolla *
 Cristina de Zotti Nassis **

ALMEIDA, C.C.S.; BOGOSSIAN, F. B.; DOI, A. P. K.; ISOYAMA, D.; SIH, G.H.; ZANOLLA, W.R.; NASSIS, C.Z - Estudo da atividade antihistamínica.

RESUMO : O suco obtido por pressão das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) apresentou atividade bloqueadora aos receptores histamínicos.

O suco contém compostos flavonóides, carboidratos e sais minerais. Uma fração flavonóide : fração B obtida através da participação do suco entre n-butanol e água contém a substância responsável pela atividade anti-histamínica.

Testando no fêo isolado de cobaia 50mg/mL de suco e 0,15 mg/mL de fração B produziu-se deslocamento à direita dose-dependente da curva de concentração resposta da histamina de modo competitivo.

O antagonismo foi específico e reversível para histamina, não modificou a resposta para a acetilcolina, KCl e BaCl₂. As respostas de permeabilidade vascular foram reduzidas em 20 a 25% em animais pré-tratados com 4mL/Kg de suco ou com 12mg/Kg de fração B. O suco e a fração B não foram efetivos em proteger a mucosa gástrica do ataque ácido gástrico.

O suco (4mL/Kg) protegeu cobaias da morte por asfixia induzida por 5 mg de histamina, a proteção durou no mínimo 1h. Concluímos que o efeito antihistamínico do suco e da fração B foi produzido por bloqueio de receptores H₁.

DESCRITORES : Suco *Kalanchoe brasiliensis*, Glicosídeos flavonóides, Antihistamínico.

INTRODUÇÃO

Kalanchoe brasiliensis (Crassulaceae), é uma planta nativa presente no litoral do Brasil, entre Espírito Santo e São Paulo. Apresenta como sinonímia científica os nomes: *Cotyledon brasiliica*, *Sempevium tectorum*.

E, como sinonímia popular: erva-da-costa, folha da fortuna, folha da costa, orelha de monge, paratudo. (Inventário de Plantas Mediciniais, Governo do Estado da Bahia).

No Brasil e na Índia a sua folha já vem sendo muito utilizada pela medicina popular como cicatrizante e adstringente intestinal e também no tratamento de picadas de inseto, abscessos e doenças de trato respiratório. (Corrêa, 1931; Governo do Estado da Bahia, 1979).

Muitos componentes como glicosídeos flavonóides (Gaind e Gupta, 1971 ; Ichikawa et al.; 1986), alcanos, alcanóides, estoróis (Gaind e Gupta, 1972 ; Siddiqui et al., 1989), compostos fenólicos (Gaind e Gupta, 1973) e bufadienólidos (Yamaquishi et al., 1989) têm sido isolados da planta. Ichikawa et al. (1986) atribuiu a propriedade antialérgica da planta à presença de um derivado quercetínico. De fato, muitos efeitos biológicos são relacionados aos flavonóides (Havsteen, 1983).

Como o suco obtido por pressão das folhas é usado no tratamento de doenças de pele e picadas de insetos no Brasil, nós investigamos a atividade antihistamínica do

suco total e de frações obtidas por partição do suco com n-butanol/água.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A planta foi coletada no litoral de São Paulo, na cidade de Caraguatatuba, sendo em seguida identificada no Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

O suco (400g) foi obtido da compressão de pelo menos 1000g das folhas. Uma alíquota do suco foi evaporada para que pudéssemos determinar o conteúdo da água. Para que se pudesse obter a fração flavonóide (presumivelmente a porção ativa), parte do suco (100g) foi particionada em mistura de n-butanol e água 200 para 100 (V/V). Ambos os extratos, o aquoso (A) e o butanólico (B) foram submetidos à destilação dos solventes, sobre pressão e caracterizados por espectrometria UV, Ressonância Magnética Nuclear Protônica e absorção atômica. Quando necessário, as amostras foram diluídas em água.

2. ENSAIOS EM ÍLEO DE COBAIA

Segmentos terminais de fêo, medindo de 1 a 2 cm, foram montados num banho contendo 20 mL de solução de Tyrode continuamente borbulhada com O₂ (95%) e CO₂ (5%) a 37°C. Uma tensão constante de 1g foi aplicada em um tecido durante o experimento. As contrações foram registradas isometricamente num fisiógrafo DMP-4(narco) e um transdutor de célula de ouro (Stathan R.). A composição da solução de Tyrode utilizada foi de: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 11,9 mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 5,05 mM D-Glicose e 1,8 mM CaCl₂.

* Acadêmicos do 5º ano da FMABC

** Prof. Auxiliar de Ensino da Disciplina de Farmacologia da FMABC. Pós-Graduada do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. (Orientadora)

Após um período de estabilização de 60 min, com lavagens a cada 20 min, duas curvas concentração/efeito (CEC), não cumulativas, foram obtidas para cada preparação, com 60 min de intervalo entre a realização de cada uma. Os antagonistas (histamina, Acth, KCl, BaCl₂) eram mantidos por 30s em contato com a preparação (adicionados ao banho) com 5 min de intervalos entre cada adição. As drogas em estudos (suco, fração A ou Fração B) foram adicionadas ao banho 20 min (o tempo necessário para se atingir o equilíbrio do bloqueio) antes da realização da segunda CEC. O antagonista permanecia em contato com o tecido (no banho) até o experimento ser completado. As CE₅₀ (concentração do antagonista que produz 50% da resposta máxima), bem como as respostas máximas foram determinadas para cada experimento.

A reversibilidade do bloqueio foi verificada pela adição de concentrações únicas de cada antagonista, concentrações essas capazes de induzir um efeito sub-máximo. Estas adições eram realizadas várias vezes a intervalos de 5 min na ausência e presença de antagonistas. A solução Tyrode contendo o antagonista era substituída por solução de Tyrode e a dose sub-máxima era testada novamente. As concentrações de banho foram: suco 25,50 e 100mg/mL; fração B 0,15 mg/mL; fração A de 1 a 10 mg/mL.

3. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR PELO MÉTODO AZUL DE EVANS.

O efeito do suco e frações sobre a permeabilidade foi observado em ratos Wistar machos (250 ± 25g) de acordo com Wilhelm et al. (1958). A pele do dorso do animal foi depilada e, imediatamente antes do teste, o animal recebeu 25 mg/Kg de azul de Evans intravenoso, bem como uma solução de 2,5% em 0,45% de NaCl.

Fatores de permeabilidade (Pfs) foram preparados em solução Ringer-Lactato e injetado por via subcutânea em volume de 0,1 mL. Cada animal recebeu 8 injeções subcutâneas consistindo em 3 doses cada de: Histamina, bradicinina e serotonina e injeções cutâneas controle de 0,1 mL de solução Ringer-Lactato. Trinta minutos depois das injeções SC os animais foram sacrificados. A quantidade de corante foi medida por excisões na pele, e extração do corante. Cada fragmento foi mantido em 5 mL de formamida a 37°C durante dois dias. A solução resultante foi filtrada e a absorbância medida a 619 mμ em espectrofotômetro Perkin-Elmer. A concentração do corante no filtrado foi determinada usando uma curva padrão relacionando a absorbância a diluições em série da solução de azul de Evans em formalde.

Os efeitos dos compostos em estudo (suco, fração B) sobre a permeabilidade vascular foram medidas após injeção intraperitoneal de 4 mL/Kg do suco, 12mg/Kg da fração B ou 4 mL/Kg de solução salina (grupo controle).

4. ATIVIDADE ANTIHISTAMINICA DO SUCO EM COBAIAS:

Quarenta e duas cobaias, de ambos os sexos, pesando entre 400 e 500g foram divididas em sete grupos (N=6). Para determinar o efeito do suco sobre a morte por asfixia causada por histamina em cobaias, os animais dos grupos 1 e 2 receberam injeção com solução salina e 4 mL/Kg de suco, respectivamente. Trinta minutos depois, cada animal recebeu 5 mg de histamina intraperitoneal.

Em outra série de experimentos, a duração do efeito protetor do suco em comparação com a clássica droga bloqueadora de H₁ foi estudada. Animais dos grupos 3 e 4 foram tratados com 4L/Kg do suco e 20 mg/Kg de

prometazina respectivamente, e 30 min, 1.5h e 2.5h depois cada animal recebeu 5 mg de histamina, (ip).

Para avaliar a influência do suco sobre a úlcera gástrica evocada pela histamina, os animais receberam 4mL/Kg de suco 4 vezes: após 0; 1.5; 3 e 4h ao começo do experimento e 5mg de histamina foi administrada 30 min depois da primeira injeção do suco (grupo 5). Este grupo foi incluído no protocolo para certificarmos que a inatividade do suco em proteger a mucosa gástrica da ulceração induzida por histamina, não foi devido a um efeito de curta duração. Os animais dos grupos 6 e 7 receberam 4mL/Kg de suco mais 10mg/Kg de prometazina e suco, mais 10mg/Kg de cimetidina, respectivamente, 30 min antes da administração de 5mg de histamina. Cinco horas depois, os animais que sobreviveram (grupos 2 e 7) foram sacrificados. A mucosa gástrica de todos os animais foi examinada.

Nas 3 séries de experimentos com porquinhos, todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal e o volume injetado foi de 1.6 à 2.0 mL.

5 DROGAS

Fosfato de histamina, iodeto de ACTH, sulfato de bradicina, e sulfato de 5-hidroxitriptamina creatinina (Sigma Chemical Co; St. Louis, MO), azul de Evans (Searle) prometazina (Fenegan Rhodia). Cimetidina (Tagamet SKF, Brasil). D-glucose, n-butanol e todos os sais minerais usados foram do Merck, (Darmstadt, Alemanha). As concentrações das drogas foram descritas.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os principais valores foram comprados pelo teste de Student para as amostra (experimentos com o fêlo da cobaia) e análise da variância e teste de Scheffe (avaliação de permeabilidade vascular). P< 0.05 foi obtido e considerado significativo estatisticamente (Snedecor e Cochran, 1973).

RESULTADOS

1. ANÁLISE DO SUCO E SUAS FRAÇÕES:

Em cada 100g (100mL) de suco, 3.4g constituíam fase aquosa (fração A) e 0.3g fase butanol (fração B). A fração B, um óleo marrom, demonstra absorção máxima de 255 a 347nm. Estes dados estão de acordo com o obtido por Gaiind e Gupta (1971) para as frações isoladas de *K. pinnata*. O espectro H NMR indicou a presença de flavonóides e carboidratos.

A fração A, um pó branco, era constituída por sais (Na⁺, Mg⁺, Ca²⁺ e Zn²⁺ detectados por espectroscopia de absorção atômica) e carboidratos (detectados por espectroscopia H NMR).

A quantidade de água contida no suco era 96.3% e a densidade era 1001g/mL. Um mL (=1g) do suco corresponde a aproximadamente 37 mg do total da extração seca: 34mg da fração B.

2. ESTUDO EM COBAIA.

O suco em concentração de 50 e 100mg/mL (50μL e 100μL/mL) e fração B em concentração de 0.15mg/mL causaram alterações nas curvas de histamina.

Os valores EC₅₀ de histamina obtidos na presença de 50mg/mL do suco ou de 0.15mg/mL de fração B não diferem significamente entre si, nem os 100mg/mL do suco, nem os 0.15mg/mL da fração B alteraram a sensibilidade da resposta máxima à : Acth, KCl ou BaCl₂, que foram testados nas faixas de concentração de 10⁻⁶ a 10⁻⁴M; 10⁻⁴ a 10⁻²M; 10⁻⁴ a 10⁻⁸ M respectivamente.

A fração A (acima de 10mg/mL) não influenciou as respostas induzidas pelos antagonistas testados, nas mesmas concentrações referidas acima.

Em experimentos destinados a estudar o equilíbrio do bloqueio e sua reversibilidade, 20min foram suficientes para estabelecer o equilíbrio e a atividade anti-histamínica do suco (e fração B) foi totalmente revertida 10 min após à retirada do suco e 5min após à retirada da fração B.

O suco e as frações não apresentaram atividade espasmogênica no fêo da cobaia quando a concentração usada foi de 200mg/mL e 10mg/mL, respectivamente.

3. EFEITO DO SUCO E FRAÇÕES SOBRE A RESPOSTA DA PERMEABILIDADE VASCULAR À HISTAMINA, SEROTONINA E BRADICININA.

A administração do suco (4g/Kg) ou fração B (12mg/Kg) i.p. em ratos diminuiu em cerca de 4 vezes a resposta de permeabilidade vascular a injeções subcutânea de 1.5 ou 10mg de histamina, porém não afetou a resposta a 2.5, 5.0 ou 10.0mg de bradicinina, ou 0.05, 0.10 ou 0.20mg de serotonina.

Não houve diferenças significativas entre o efeito antagônico obtido com 4mL de suco/Kg e com a fração B (12mg/Kg) em relação às respostas induzidas por histamina.

4. EFEITO DO SUCO SOBRE A BRONCOCONSTRIÇÃO E ULCERAÇÃO GÁSTRICA EVOCADA PELA HISTAMINA, EM COBAIAS.

A administração do suco protegeu contra a broncoconstrição induzida por uma dose de 5mg de histamina, os animais do grupo 2 (4mL/Kg de suco) sobreviveram enquanto os animais tratados com solução salina morreram em menos de 2min após a administração de histamina.

Os animais do grupo 3 (pré-tratados com 4mL/Kg do suco) ainda sobreviveram quando uma segunda dose de histamina foi administrada 1h depois, porém morreram depois da terceira dose dada 2h depois, i.e., 2.5h depois do tratamento. Isto mostra que o efeito protetor do suco é de pequena duração em comparação com os animais do grupo 4 que foram pré-tratados com prometazina, que não morreram após receber a terceira dose de histamina.

Não foram observadas lesões na superfície da mucosa gástrica nos animais dos grupos 6 e 7 (pré-tratados com 4mL/Kg do suco e 20mg/Kg de prometazina, respectivamente, adicionado a 10mg/Kg de cimetidina). Em outros grupos: exceto animais do grupo 1 que morreram 2min depois da dose de histamina, todos os animais apresentaram de 3 à 6 lesões cada um.

DISCUSSÃO

Os dados presentes nos mostram que o suco obtido de *K. brasiliensis* e fração flavonóidica (fração B) inibem contrações induzidas por histamina no fêo da cobaia, produzindo um deslocamento à direita da curva dose-resposta não cumulativa de histamina sem reduzir a resposta máxima. O antagonista é reversível e altamente seletivo por histamina, não modificando a resposta para acetilcolina, KCl, B_2CL_2 no fêo de cobaia. Na dose testada, o suco comportou-se como um antagonista competitivo. A resposta de permeabilidade

vascular à histamina foi seletivamente antagonizada tanto pelo suco como pela fração B.

A curva construída em fêo de cobaia perfundido com 0.15mg/mL de fração B sofreu um deslocamento à direita dose dependente.

A mesma relação de potência foi observada em efctos antagônicos de 12mg/Kg de fração B e 4mL de suco.

Considerando que a contração do músculo liso pela histamina é determinada principalmente pela ativação dos receptores H_1 e que estes receptores são importantes para a resposta da permeabilidade vascular e a participação dos receptores H_2 é incerta (Garrison, 1990), a atividade antagonista dos componentes do suco é provavelmente devido ao bloqueio dos receptores H_1 .

O músculo dos brônquios das cobaias são muito sensíveis a histamina e a morte por asfixia ocorre com pequenas doses de histamina. A cobaia pode sobreviver a doses maiores se um antagonista H_1 for administrado (Garrison, 1990).

Altas doses de histamina aumentam a secreção de Hcl gástrico podendo produzir severas lesões na mucosa gástrica. Este efeito não é evitado por antagonistas H_1 porque este efeito é mediado por receptores H_2 .

A proposta do experimento *in vivo* com cobaias foi a de determinar se a dose do suco que inibe o aumento da permeabilidade ao usar histamina pode proteger a cobaia da morte por asfixia e da úlcera gástrica quando altas doses de histamina forem injetadas.

Assim como ocorre com a prometazina (um antagonista H_1), o suco apresentou os seguintes efeitos: 1) Previu a broncoconstrição induzida por histamina embora o efeito protetor foi de pequena duração; 2) Não foi eficaz na proteção da mucosa gástrica ao se induzir a ulceração através da ação da histamina.

Esses achados indicaram a existência de um ou mais componentes no extrato de *K. brasiliensis* que bloqueiam seletivamente os receptores H_1 de modo competitivo. Em estudos fitoquímicos anteriores (Gand e Gupta, 1972; Ichikawa et al., 1986) componentes isolados eram extraídos da planta íntegra. Nosso estudo demonstra que glicosídeos estão presentes também no suco extraído da folha junto com carboidratos e sais minerais. Outras substâncias não foram encontradas ao menos em concentrações que poderiam ser detectadas pela H RMN espectroscopia.

CONCLUSÃO

O presente trabalho nos permite concluir que o suco da *K. brasiliensis* apresenta atividade antihistamínica seletiva aos receptores H_1 , comportando-se como um inibidor competitivo reversível. Sua ação não altera a atividade da histamina, e sim faz com que seja necessária uma concentração maior desta para que possa surtir o mesmo efeito máximo.

Entretanto, verificamos sua ineficácia na proteção da mucosa gástrica, mas agindo de forma eficaz na prevenção da broncoconstrição induzida por histamina e demonstrando uma redução da ação desta permeabilidade vascular sendo que ambos os efeitos são devidos a receptores H_1 .

Devemos lembrar que o mecanismo de proteção da mucosa gástrica e predominantemente relacionada aos receptores H_2 , logo deduzimos que sua ação nestes receptores de maneira competitiva à histamina não se faz perceptível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORRÊA, M.P.. - Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da agricultura, Rio de Janeiro, 1931.
2. GAIND K.N. & GUPTA, R.L.. - Phenolic components from the leaves of *K.pinnata* In: Planta Médica, 1971, v.20, p.149-53.
3. GAIND K.N. & GUPTA R.L. - Alkanes, alkanols, triterpenes and sterols of *K.pinnata* In: Phytochemistry, 1972, v.11, p.1500-2.
4. GAIND K. N. GUPTA R.L. - Flavonoids glycosides from *K.pinnata* In: Planta Médica, 1973 v.23, p.368-73.
5. GARRISON, J. C.. - Histamine, bradykinin, 5-hydroxytryptamine and their antagonists. In: Gilman, A. G.; Rall, T. W.; Nies, A.S. & Taylor, P. - The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th, New York, 1990, p.575-99.
6. Governo do Estado da Bahia Inventário das Plantas Medicinais do Estado da Bahia v.1, Governo da Bahia, Salvador, 1979, p.524-5.
7. HAVESTEEN, B.. - Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology, 1983, v.32, p.1141-8.
8. HEGNAUER, R.. - Chenotaxonomie der Pflanzen, Birkhauser Verlag, Basel, 1966.
9. ICKIKAWA, M.O.M & IJIMA, T.. - Antialergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*, Chemical Abstracts, Tokyo, Japan, 1986, v.105.
10. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W. G. Statistical Methods, 6.ed, State University Press, 1973.
11. WILHELM, D.L.; MILL, P.J.; SPARROW, E.M.; MCKAY, M.E. & MILES, A.A.. - Enzyme-like globulins from serum, reproducing the vascular phenomena of inflammation. IV. Active permeability factor and the rabbit. British Journal of Experimental Pathology, 1958 v.39, p.228-50.
12. YAMAQUISHI, T.; YAN, X.Z. MACPHAIL, D.R.; MACPHAIL, A.T.; & LEE K. - Structure and Stereochemistry of briophyllin A Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1988, v.36, p.1616-7.
13. YAMAQUISHI, T.; HARUNA, M.; YAN, X.Z.; CHANG II & LEE KII. Antitumor agents, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *B.pinnatum*. Journal of Natural Products, 1989, v.52, p.1071-79.

ALMEIDA, C.C.S.; BOGOSSIAN, F.B.; DOI, A.P.K.; ISOYAMA, D.; SIH, G.H.; ZANOLLA, W.R.; NASSIS, C.Z. - Study of antihistamine activity of *Kalanchoe brasiliensis*.

SUMMARY: The juice obtained by pressing the leaves of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) exhibited histamine-blocking activity.

The juice contains flavonoid compounds, carbohydrates and mineral salts. A flavonoid fraction (fraction B) obtained by partitioning the juice between n-butanol and water contained the substance responsible for the antihistamine activity.

When assayed on the isolated guinea pig ileum, 50mg/mL juice and 0.15mg/mL fraction B produced parallel and concentration dependent rightward displacement of the concentration response curve to histamine apparently in a competitive manner.

The antagonism was specific and reversible for histamine, i.e., did not modify the response to acetylcholine, KCl and BaCl. Vascular permeability responses to histamine were decreased by about 20-25% in animals pretreated with 4mL/Kg of juice or with 12 mg/Kg fraction B. The juice was ineffective in protecting the gastric mucosa from histamine induced ulceration.

The juice 4 mL/Kg protected guinea pigs from death by asphyxia induced by 5mg histamine and the protection lasted at least 1h. We conclude that the antihistaminic effect of the juice and fraction B was produced by blockade of H₁ receptors.

SUBJECT HEADINGS: Juice of *Kalanchoe brasiliensis*, flavonoid glycosides, antihistamine

Agradecimento: Prof. Dr. Marx Young
Prof. Dr^a. Astréa M. Giesbrecht
Sr. Álvaro Franco de Andrade Junior
Srta. Adriana Matukuma Rodrigues