

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOLÓGICA *IN VITRO*  
DE *Alchornea* spp QUANTO À PRODUÇÃO DE PERÓXIDO  
DE HIDROGÊNIO, ÓXIDO NÍTRICO E FATOR DE  
NECROSE TUMORAL- $\alpha$  POR MACRÓFAGOS MURINOS**

***FLÁVIA CRISTINE MASCIA LOPES***

**ARARAQUARA - SP**

**2004**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOLÓGICA *IN VITRO*  
DE *Alchornea* spp QUANTO À PRODUÇÃO DE PERÓXIDO  
DE HIDROGÊNIO, ÓXIDO NÍTRICO E FATOR DE  
NECROSE TUMORAL- $\alpha$  POR MACRÓFAGOS MURINOS**

***FLÁVIA CRISTINE MASCIA LOPES***

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
ANÁLISES CLÍNICAS, ÁREA DE IMUNOLOGIA CLÍNICA**

**ORIENTADORA: Prof. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos**

**ARARAQUARA - SP**

**2004**

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

L864a Lopes, Flávia Cristine Mascia  
Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- $\alpha$  por macrófagos murinos. / Flávia Cristine Mascia Lopes . – Araraquara, 2004.  
146 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos

1. Alchornea triplinervia. 2. Alchornea glandulosa. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Óxido nítrico. 5. TNF- $\alpha$ . 6. Ação antiinflamatória. I. Carlos, Iracilda Z., orient. .II. Título.

**CDD: 615.37**

**CAPES: 4030005**

## **DADOS CURRICULARES**

### **DADOS PESSOAIS**

**NOME** Flávia Cristine Mascia Lopes

**NASCIMENTO** 19/05/1977

**NATURALIDADE** Araraquara-SP

**NACIONALIDADE** brasileira

**ESTADO CIVIL** solteira

**FILIAÇÃO:**

**PAI** Francisco Augusto da Silva Lopes

**MÃE** Clotilde Mascia Lopes

**PROFISSÃO** Farmacêutica-Bioquímica

**DOCUMENTO DE IDENTIDADE** 28257901-1

**CADASTRO DE PESSOA FÍSICA** 292332708-07

**ENDEREÇO RESIDENCIAL** Rua Carvalho Filho, 1969

Fonte – CEP: 14802-412

Araraquara – São Paulo

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

BACHAREL EM FARMÁCIA, CURSO DE FARMÁCIA-BIOQUÍMICA CONCLUÍDO EM 2002 NA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE ARARAQUARA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

MESTRE EM ANÁLISES CLÍNICAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMUNOLOGIA CLÍNICA, CONCLUÍDO EM 18 DE NOVEMBRO DE 2004 NA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CÂMPUS DE ARARAQUARA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

## **ESTÁGIOS**

Estágio de Treinamento no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos

Estágio de Iniciação Científica no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos

Bolsista FAPESP

Estágio de Docência na Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos

## **TRABALHOS CIENTÍFICOS**

### **TRABALHOS APRESENTADOS**

#### **SIMPÓSIO**

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; SANTOS, L. E.; PLACERES, M. P.; CARLOS, I. Z. Avaliação da Atividade Imunológica de *Achillea millefolium* L. (Mil- Folhas). IV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Salvador-BA, 2003.

#### **CONGRESSOS**

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Inter-relação entre o óxido nítrico e o TNF- $\alpha$  na resposta imunológica induzida pela *Achillea millefolium* L. VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, São Pedro-SP, 2003.

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Perfil cromatográfico e avaliação da imunidade celular *in vitro* utilizando extrato etanólico da *Achillea millefolium* L. VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, São Pedro-SP, 2003.

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Essential oil of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in the immune response. XXVIII Meeting of Brazilian Society of Immunology, Mangaratiba – RJ, p. 126, 2003.

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos ativados pela *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). 50<sup>a</sup> Jornada Farmacêutica da UNESP, 2003.

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. *Achillea millefolium* L. (Asteracea) and its action in the immune system. 4<sup>th</sup> Congress of Pharmaceutical Science, Ribeirão Preto-SP. Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica, v. 39, n. 2, p. 167, 2003.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Avaliação da atividade imunológica in vitro da planta *Alchornea glandulosa* Poepp. 51<sup>a</sup> Jornada Farmacêutica da UNESP, 2004.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of LPS-induced NO production by *Alchornea glandulosa*. XIII Congresso Italo-Latino Americano di Etnomedicina “Paolo Ceccherelli”, Salerno - Itália, 2004.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; CAMPANER, L.; CALVO, T. R.; RINALDO, D.; VILEGAS, W. Action of *Davilla elliptica* methanolic extract in the celular immune response. XIII Congresso Italo-Latino Americano di Etnomedicina “Paolo Ceccherelli”, Salerno - Itália, 2004.

### TRABALHOS PUBLICADOS

LOPES, F. C. M.; PLACERES, M. P.; MOREIRA, R. R. D.; SANTOS, L. E.; CARLOS, I. Z. Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. (mil-folhas). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v.13, n.2, p.11-13, 2003.

LOPES, F. C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Ativação de macrófagos por produtos naturais obtidos da *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêutica**, Araraquara, n.1, p.61-69, 2003.

### TRABALHOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- $\alpha$  production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**.

LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Immunostimulatory effects of *Achillea millefolium* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; CAMPANER, L.; CALVO, T. R.; RINALDO, D.; VILEGAS, W. Action of *Davilla elliptica* methanolic extract in the cellular immune response. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica  
do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CAPES  
(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Aos meus pais, Francisco e Clotilde,  
agradeço todo o apoio, exemplo, amor, carinho e  
incentivo que me possibilitaram estar hoje onde estou.  
Essa nova conquista não é só minha... é nossa!

Ao meu namorado, Cleso,  
por todo amor, atenção, paciência, afeto e companhia.  
Obrigada por estar sempre presente  
em minha vida, nos dias bons e ruins.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos,  
por ter acreditado em mim e ter sempre me incentivado.

## Agradecimento a Deus

Pedi **Força e Vigor**, e Deus me mandou dificuldades para me fazer forte.

Pedi **Sabedoria**, e Deus me deu problemas para resolver.

Pedi **Prosperidade**, e Deus me deu energia e cérebro para trabalhar.

Pedi **Coragem**, e Deus me mandou situações perigosas para superar.

Pedi **Amor**, e Deus me mandou pessoas com problemas para eu ajudar.

Pedi **Favores**, e Deus me deu oportunidades.

Não recebi nada do que queria !

Mas recebi tudo o que precisava !

Minhas preces foram atendidas!!!

Autor Desconhecido

## Agradecimentos

*Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas por todo o seu conhecimento e ajuda durante a realização deste trabalho.*

*A Prof. Dra. Celeni Mara Marxocchi Machado e ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi por todos os ensinamentos e valiosa contribuição.*

*Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelas sugestões apoio e amizade.*

*A Prof. Regina Célia Vendramini pelo constante incentivo e amizade.*

*Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa por toda a colaboração.*

*Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti por sua constante ajuda.*

*A Prof. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi e aos pós-graduandos Karina, Verônica e Rodrigo, pelo apoio desde os tempos de iniciação científica.*

*A Prof. Dra. Marisa Veiga Capela e ao Prof. Dr. Jorge Manuel Vieira Capela, pelo indispensável auxílio durante a análise estatística.*

*A Marisa Campos Pólesi Placeres por toda ajuda e amizade.*

*Aos amigos do laboratório, Micheli, Márcia, Cynthia, Danielle, Fabiana, Fernanda (Ber), Fernanda Kinouchi, Paula, Ana Mary, Camila, Amanda, Diego, Rualdo, Ângela, Marinaide, Fran, Emiliana, Michelle, Anderson, Karina, Nayara, Marília... pelos bons momentos de convivência.*

*A Prof. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira e ao Luis Eduardo dos Santos, por sempre me incentivarem a gostar das plantas desde a época da graduação.*

*Ao Prof. Dr. João Olímpio Fognolli, por sua incessante ajuda.*

*A Tamara Regina Calvo, por ser minha companheira no convívio com a *Alchornea triplineris* e a *Alchornea glandulosa*.*

*Aos funcionários da biblioteca: Moacir, Irani, Ana Cristina Maximiliano, Laura, Ana Lúcia, Sônia, Keila, Natalina... por todo o apoio recebido e verdadeira amizade.*

*As funcionárias da pós-graduação, Cláudia, Sônia, Laura... por toda atenção e orientação.*

*A Eliana e Tereza, pela disponibilidade e apoio.*

*A pós-graduanda Ana Paula Rodrigues por me ensinar a lidar com o P.M.A.*

*A todos os meus professores do curso de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara por terem proporcionado um ensino de qualidade contribuindo para a minha formação.*

*A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara por estarem sempre dispostos a cooperar.*

*A todos os meus colegas de graduação da Turma 69, pela amizade e incentivo. Momentos especiais como os que passamos juntos jamais serão esquecidos.*

*A toda minha família pela confiança, incentivo e carinhosa convivência.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.*

*Ao Programa Biota - Fapesp.*

*A todos os meus amigos que sempre me fizeram muito feliz.*

*E a todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, o meu muito obrigada!*

“Tantas vezes pensamos ter chegado.  
Tantas vezes é preciso ir além.”

Fernando Pessoa

**SUMÁRIO**

LISTA DE TABELAS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	X
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Plantas medicinais: importância através dos tempos .....	2
1.2. O potencial das plantas medicinais e da Fitoterapia .....	13
1.3. As plantas medicinais e a Fitoterapia no Brasil .....	18
1.4. O sistema imunológico .....	20
1.5. As plantas medicinais e a imunologia .....	32
1.6. O gênero <i>Alchornea</i> .....	35
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1. Etapa botânica .....	45
3.2. Etapa química .....	45
3.2.1. Obtenção do extrato metanólico das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	46
3.2.2. Obtenção da fração acetato de etila das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	46
3.2.3. Estudos fitoquímicos .....	46

---

3.2.4. Extratos e frações para ensaios biológicos .....	47
3.3. Etapa imunológica .....	48
3.3.1. Animais .....	48
3.3.2. Obtenção dos macrófagos peritoneais .....	48
3.3.3. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais .....	49
3.3.4. Avaliação da citotoxicidade .....	50
3.3.4.1. Viabilidade celular na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) .....	51
3.3.4.2. Viabilidade celular na presença dos extratos metanólicos das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	52
3.3.4.3. Viabilidade dos macrófagos estimulados por PMA na presença dos extratos e frações das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	52
3.3.4.4. Viabilidade dos macrófagos estimulados por LPS na presença dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila das plantas <i>A.</i> <i>triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	52
3.3.5. Avaliação da estimulação de macrófagos .....	53
3.3.5.1. Determinação da liberação de água oxigenada (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por macrófagos peritoneais de camundongos .....	53
3.3.5.2. Determinação de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos .....	54
3.3.5.3. Determinação da liberação da citocina TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais de camundongos .....	55

---

3.3.6. Determinação da atividade inibitória dos extratos e frações de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NO e TNF- $\alpha$ .....	56
3.3.6.1. Quanto à produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
3.3.6.2. Quanto à produção de NO .....	56
3.3.6.3. Quanto à produção TNF- $\alpha$ .....	57
3.3.6.4. Cálculo da porcentagem de inibição .....	57
3.3.7. Análise estatística .....	58
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1. Estudos fitoquímicos .....	60
4.2. Avaliação da citotoxicidade .....	62
4.2.1. Viabilidade celular na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) .....	62
4.2.2. Viabilidade celular na presença dos extratos metanólicos das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	63
4.2.3. Viabilidade dos macrófagos estimulados por PMA na presença dos extratos e frações das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	66
4.2.4. Viabilidade dos macrófagos estimulados por LPS na presença dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila das plantas <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	70
4.3. Avaliação da estimulação de macrófagos .....	74
4.3.1. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	74
4.3.2. Determinação de óxido nítrico (NO) .....	76
4.3.3. Determinação do TNF- $\alpha$ .....	78

4.4. Determinação da atividade inibitória dos extratos e frações de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NO e TNF- $\alpha$ .....	80
4.4.1. Quanto à produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	80
4.4.2. Quanto à produção de NO .....	84
4.4.3. Quanto à produção de TNF- $\alpha$ .....	88
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>116</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>118</b>
<b>VIII. APÊNDICE .....</b>	<b>147</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Uso dos vegetais através dos tempos (CARVALHO et al., 2004) .....	12
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de alguns medicamentos obtidos a partir de plantas (MANS et al., 2000)...16	
<b>Tabela 3:</b> Funções do óxido nítrico no sistema imune (BOGDAN, 2001) .....	28
<b>Tabela 4:</b> Principais constituintes da <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> observados em CCDC ....	61
<b>Tabela 5:</b> Viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença das preparações obtidas dos extratos metanólicos da <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> em diferentes concentrações .....	65
<b>Tabela 6:</b> Viabilidade dos macrófagos peritoneais estimulados com PMA (0,2µM) na presença das preparações obtidas dos extratos e frações da <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> em diferentes concentrações .....	69
<b>Tabela 7:</b> Viabilidade dos macrófagos peritoneais estimulados com LPS (1µg/mL) na presença das preparações obtidas dos extratos e frações da <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> em diferentes concentrações .....	73
<b>Tabela 8:</b> Efeito inibitório das preparações obtidas dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> na produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em macrófagos estimulados por PMA .....	83
<b>Tabela 9:</b> Efeito inibitório das preparações obtidas dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> na produção de NO em macrófagos estimulados por LPS .....	87

**Tabela 10:** Efeito inibitório das preparações obtidas dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados por LPS ..... 91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Produção dos intermediários reativos do oxigênio, adaptado de Roitt e Delves, 2001 .....	23
<b>Figura 2:</b> Isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) (DUSSE et al., 2003) .....	25
<b>Figura 3:</b> Reação bioquímica que mostra a síntese de NO em células de mamíferos, adaptado de MacMicking et al., 1997 .....	26
<b>Figura 4:</b> Atividades biológicas do TNF- $\alpha$ (EIGLER et al., 1997) .....	30
<b>Figura 5:</b> <i>Alchornea triplinervia</i> . (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira (Lorenzi, 1992) .....	37
<b>Figura 6:</b> <i>Alchornea glandulosa</i> . (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira. (Lorenzi, 1992) .....	38
<b>Figura 7:</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) .....	63
<b>Figura 8:</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> .....	64
<b>Figura 9:</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por PMA na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> . .....	67
<b>Figura 10:</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por PMA na presença de diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> .....	68
<b>Figura 11:</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> .....	71

---

<b>Figura 12:</b> Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Alchornea triplinervia</i> e <i>Alchornea glandulosa</i> .....	72
<b>Figura 13:</b> Produção de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	75
<b>Figura 14:</b> Produção de Óxido Nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	77
<b>Figura 15:</b> Produção de TNF- $\alpha$ em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> .....	79
<b>Figura 16:</b> Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> na produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por PMA .....	81
<b>Figura 17:</b> Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> na produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por PMA .....	82
<b>Figura 18:</b> Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> na produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS .....	85
<b>Figura 19:</b> Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>A. triplinervia</i> e <i>A. glandulosa</i> na produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS .....	86

**Figura 20:** Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS  
..... 89

**Figura 21:** Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS  
..... 90

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

°C: graus Celsius

·OH: radical hidroxila

μmols: micromols

μg: microgramas

μL: microlitro

μM: micromolar

A-431: linhagem de carcinoma epidermóide

ACN/Água: acetonitrila/água

AcOEt: acetato de etila

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA: análise de variância

AZT: azatioprina

BH<sub>4</sub>: tetraidrobiopterina

cm: centímetro

CC: cromatografia em coluna

CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa

CMI: concentração mínima inibitória

cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

COX-1: ciclooxigenase tipo 1

COX-2: ciclooxigenase tipo 2

DCCC: cromatografia de contra-corrente de gotejamento

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxiribonucléico

EGb 761: extrato padronizado de *Gingko biloba*

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

EM: espectrometria de massa

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

EUA: Estados Unidos da América

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

Fe<sup>2+</sup>: íon ferroso

Fe<sup>3+</sup>: íon férrico

FeCl<sub>3</sub>: cloreto férrico

FMN: flavina mononucleotídeo

g: grama

GPC: cromatografia de permeação em gel

H<sub>2</sub>O: água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

Hep-G2: linhagem de carcinoma hepatocelular

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2: vírus da imunodeficiência humana tipo 2

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência.

HSCCC: cromatografia de contra-corrente de alta velocidade

I $\kappa$ B:

IFN- $\gamma$ : interferon-gama

IL-1: interleucina-1

IL-2: interleucina-2

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IV: infravermelho

kd: kilodaltons

LBP: proteína ligante do lipopolissacarídeo

LPS: lipopolissacarídeo

M: molar

MDA-MB-231: linhagem de adenocarcinoma mamário

m: metro

mg: miligrama

MeOH: metanol

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

N: normal

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NaNO<sub>2</sub>: nitrito de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NBT: *nitroblue tetrazolium*

NF $\kappa$ B: Fator nuclear  $\kappa$ B

ng: nanogramas

NHA: N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina

NK: células *natural killer*

nmols: nanomols

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito

NOS: óxido nítrico sintase

NP/PEG: *Natural product/polyethylenoglicol*

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido

O<sub>2</sub>: oxigênio

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito

ONOOH: ácido peroxinitroso

PBS: solução salina tamponada com fosfato

pg: picogramas

PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E2

PKC: proteína quinase C

PMA: forbol miristato acetato/ *phorbol myristate acetate*

PMNs: polimorfonucleares

PVPP - polivinil-polipirrolidona

RMN: ressonância magnética nuclear

RNA: ácido ribonucléico

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

SOD: superóxido dismutase

TFA: ácido trifluoracético

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral - alfa

UV: ultra-violeta

XAD2: poliestireno-divinilbenzeno

---

## **RESUMO**

A utilização dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é tão antiga quanto a espécie humana. Contudo, a maioria das espécies de plantas não foi investigada química ou biologicamente. Várias plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram modular a resposta imunológica. O sistema imunológico é um notável sistema de defesa que evoluiu nos vertebrados para protegê-los de microorganismos patogênicos invasores e do câncer. Macrófagos têm um papel central nesse sistema, pois são células capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos, entre esses, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas. Neste trabalho, o extrato metanólico e a fração acetato de etila das plantas *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa* foram estudados. Seus efeitos foram avaliados no sistema imunológico murino, utilizando-se culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. Testes de viabilidade celular foram realizados para assegurar o desenvolvimento experimental. A pesquisa de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) foi realizada através de metodologias espectrofotométricas e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foi determinado através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Foram avaliadas as capacidades dos extratos e frações estimularem ou inibirem o sistema imunológico murino. As plantas não mostraram propriedades imunoestimulantes, uma vez que não foram observadas liberações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$ . Entretanto, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO pelos macrófagos estimulados por PMA ou LPS, respectivamente, foi fortemente inibida tanto pelos extratos quanto pelas frações das duas plantas testadas. Neste trabalho, ainda foi observado que a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos ativados por LPS, pôde ser parcialmente inibida. A concentração de 15,62 $\mu$ g/mL do extrato metanólico de *A. triplinervia* (com viabilidade celular superior a 95%), mostrou inibir 88,35% da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 52,54% de NO e 10,41% de TNF- $\alpha$ . Enquanto que a fração acetato de etila, da mesma planta e na mesma concentração (com viabilidade celular superior a 90%), inibiu 72,25% da

produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 47,80% de NO e 16,41% de TNF- $\alpha$ . Com relação ao extrato metanólico de *A. glandulosa* na concentração de 15,62 $\mu$ g/mL (com viabilidade celular superior a 91%), houve inibição de 88,62% da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 32,40% de NO e 11,61% de TNF- $\alpha$ . A fração acetato de etila, da mesma planta e na mesma concentração (com viabilidade celular superior a 92%), inibiu 70,56% da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 21,67% de NO e 12,21% de TNF- $\alpha$ . Nas determinações de NO e TNF- $\alpha$ , a porcentagem de inibição aumentou conforme a utilização de concentrações mais elevadas, enquanto que na determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esse fato não foi observado. Através da análise dos resultados obtidos, pode-se sugerir que os extratos metanólicos e as frações acetato de etila obtidos da *A. triplinervia* e *A. glandulosa* podem apresentar atividade antiinflamatória, confirmando dessa maneira seu uso popular.

■ PALAVRAS-CHAVE: *Alchornea triplinervia*; *Alchornea glandulosa*; extrato metanólico; fração acetato de etila; macrófagos; peróxido de hidrogênio; óxido nítrico; fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; ação antiinflamatória.

---

## ***ABSTRACT***

The use of natural resources as treatment and healing for diseases is as old as the human species. However, most of all plant species were not investigated chemistry or biologically. Many plants used in the traditional medicine modulate the immunological response. The immune system is a remarkably adaptive defense system that has evolved in vertebrates to protect them from invading pathogenic microorganisms and cancer. Macrophages play an important role in this system because they are cells capable to secrete many biological active products such as reactive nitrogen and oxygen species and cytokines. In this work, methanolic extract and ethyl acetate fraction obtained from *Alchornea triplinervia* and *Alchornea glandulosa* were studied in the murine immune system using peritoneal macrophages cultures from Swiss mice. Cell viability assays were realized to assure the experimental development. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nitric oxide (NO) were determined by espectrophotometric procedures and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). The ability of methanolic extract and ethyl acetate fraction to stimulate or inhibit the murine immune system was evaluated. These plants didn't show immunostimulating properties, once liberation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO and TNF- $\alpha$  were not observed. However, extracts and fractions from both plants, strongly inhibited NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production induced by LPS and PMA, respectively. Production of TNF- $\alpha$  by LPS-stimulated macrophages was partially inhibited. The concentration of 15,62 $\mu$ g/mL from *A. triplinervia* methanolic extract (cellular viability > 95%) showed to inhibit 88,35% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 52,54% of NO and 10,41% of TNF- $\alpha$  production. The ethyl acetate fraction of the same plant and concentration (cellular viability > 90%), inhibited 72,25% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 47,80% of NO and 16,41% of TNF- $\alpha$  production. Regarding the *A. glandulosa* methanolic extract in the concentration of 15,62 $\mu$ g/mL (cellular viability > 91%), there was a production inhibition of 88,62% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 32,40% of NO and 11,61% of TNF- $\alpha$ . The ethyl acetate fraction of the same plant and

concentration (cellular viability > 92%), inhibited 70,56% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 21,67% of NO and 12,21% of TNF - $\alpha$  production. In the NO and TNF- $\alpha$  assays, the inhibition percentage grows according to increasing concentrations, but this fact was not noticed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determination. According to these results, it is suggested that methanolic extracts and ethyl acetate fractions from *A. triplinervia* and *A. glandulosa* can present anti-inflammatory activity, confirming their traditional use.

■ KEY WORDS: *Alchornea triplinervia*; *Alchornea glandulosa*; methanolic extract; ethyl acetate fraction; macrophages; hydrogen peroxide; nitric oxide; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; anti-inflammatory activity

---

## ***I - INTRODUÇÃO***

### 1.1. Plantas medicinais: importância através dos tempos

Thomas Carlyle certa vez disse: “o que é todo o conhecimento a não ser uma experiência recordada, ou um produto da história?”(PHILLIPSON, 2003).

A partir de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso de plantas medicinais (SCHULZ et al., 2002). Na origem da história, quando o saber popular emerge das trevas, a utilização de vegetais como forma de curar ou evitar doenças passa a ser um objeto de interesse (CARVALHO, 2004).

O emprego dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é tão antigo quanto a espécie humana (DI STASI, 1995). Por um longo tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram fontes principais de medicamentos (RATES, 2001). Na verdade, a utilização de recursos naturais provavelmente antecede o *Homo sapiens* moderno. Evidências encontradas em escavações do Paleolítico mostram que o conhecimento das plantas medicinais existe há pelo menos 60.000 anos (SUMNER, 2000). Arqueólogos encontraram pólen e fragmentos de flores de diversas plantas medicinais no sítio arqueológico do homem de Neanderthal no Iraque. *Ephedra*, *Centaurea*, *Senecio*, *Althea* e *Achillea* estavam entre as espécies identificadas, comprovando o uso comum de várias plantas no passado (TYLER, 2000).

O uso das espécies vegetais, com a finalidade de curar doenças, remonta ao início da civilização, a partir do momento em que o homem despertou sua consciência e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício (DI STASI, 1995).

Os primeiros bons médicos que existiram eram sábios colecionadores de plantas. Eram seres humanos antigos, mas não necessariamente primitivos, que possuíam um conhecimento superior da prática botânica. Curandeiros tinham o conhecimento específico das plantas locais e

sabiam como utilizá-las para curas efetivas. O conhecimento antigo das plantas medicinais fez parte de uma tradição oral, passada de curandeiro para curandeiro através das gerações, na pré-história. Esse conhecimento preciso era adquirido por meio da observação cuidadosa e também pela experimentação (SUMNER, 2000).

Investigações científicas demonstram que, entre os anos de 5.000 e 2.800a.C., o homem domesticava animais, cultivava cereais e utilizava algumas plantas medicinais. Por instinto, observando pássaros e outros animais, o homem selecionou e experimentou vegetais com finalidade terapêutica. O homem, dotado de inteligência, desde cedo observou o gesto dos animais e verificou o poder curativo das ervas (CARVALHO, 2004).

No desenvolvimento da cultura humana, o uso dos produtos naturais tem tido um significado mágico-religioso. Diferentes pontos de vista podem ser observados, levando-se em consideração os conceitos de saúde ou doença existentes em cada cultura (RATES, 2001). Povos inteiros dominavam os segredos das plantas medicinais, associando-os, muitas vezes, à magia e a rituais religiosos (YAMADA, 1998).

O conhecimento escrito da medicina botânica data de cerca de 6.000 anos atrás. Blocos de argila sumérios encontrados em Nippur eram listas cuneiformes de medicamentos contendo plantas medicinais. Apesar do conhecimento da matemática e da ciência, os Sumérios, Assírios e Babilônios atribuíam as doenças a agentes sobrenaturais e enfatizavam o papel dos sacerdotes nas curas divinas. A prática da medicina, utilizando ervas medicinais, foi deixada para especialistas e sábios, como é o caso do rei assírio Assurbanipal, que deixou blocos relacionando trezentas plantas medicinais, como o ópio e a mirra (SUMNER, 2000). Nesses blocos, encontram-se diversas receitas e referências a vários medicamentos de que dispunham os médicos da época: heléboro, meimendro, mandrágora, papoula, cânhamo, canela, assa-fétida, mirra, timo, salgueiro, figo, tâmara, leite, peles de serpentes, carapaças de tartarugas, cloreto de sódio e salitre entre

cerca de 250 plantas medicinais, 120 substâncias minerais e 180 de origem animal (CARVALHO, 2004).

As mais antigas obras sobre medicina e plantas medicinais surgiram na China e no Egito. No livro do Pen Tsao Ching e nos Papiros, bem como na Bíblia escrita pelos Hebreus, são encontradas milhares de citações sobre o emprego de plantas medicinais e preparações à base de produtos do reino vegetal (CARVALHO, 2004).

A China antiga é uma fonte importante de informações sobre o uso primitivo de medicamentos à base de plantas (KONG et al., 2003). Em uma época conhecida pelos chineses como período Sheng Nung (2800 a.C.), após o desenvolvimento de uma sociedade agrária, foi descoberto que a ingestão de plantas poderia ser útil na cura de certas doenças. Nesse período, centenas de plantas foram experimentadas e o povo da época aprendeu como utilizá-las, evitando as substâncias venenosas. Existem relatos citando pessoas que utilizaram essas plantas e viveram mais de 70 anos (HUANG, 1999).

Acredita-se que o imperador chinês Shen Nung tenha escrito o primeiro livro ilustrado sobre plantas. O Pen Tsao, foi a primeira farmacopéia que reuniu o modo de preparo e uso de 365 plantas medicinais (SUMNER, 2000). Entre as 365 plantas mais utilizadas estavam o ginseng e a efedra (NATURAL HEALTH, 2004; NATURALEZA EDUCATIVA, 2004).

Na época das civilizações egípcias, já existiam numerosas informações sobre plantas medicinais (KONG et al., 2003). Alguns papiros oferecem grande quantidade de ensinamentos sobre o conhecimento empírico e os conhecimentos práticos dos cirurgiões desse período (CARVALHO, 2004). Os antigos egípcios listaram mais de 850 plantas e medicamentos no Papiro de Ebers, um pergaminho médico com mais de 70 metros de comprimento vendido a George Ebers por um árabe em 1870. O pergaminho data de aproximadamente 1500 a.C. (SUMNER, 2000). Nesse célebre papiro, são encontradas indicações sobre plantas locais e

exóticas (papoula, ginseng, rícino, romã, mandrágora, mirra, incenso, aipo, coentro, azeite) utilizadas no tratamento de doenças internas, afecções oculares, ginecológicas e dermatológicas (CARVALHO, 2004).

Os egípcios acreditavam que o alho repelia cobras e impedia as tênias. Os escravos que construíam as pirâmides eram alimentados com alho e cebola com o intuito de prevenir infecções, enquanto que os membros da realeza eram sepultados com coleções de plantas medicinais, perfumes e cosméticos na tentativa de suprir suas necessidades na jornada rumo à imortalidade (SUMNER, 2000).

Entre os primeiros escritos sânscritos de aproximadamente 1500 a.C., está o poema Rig Veda que detalha informações médicas. O Rig Veda foi a base do sistema de medicina Ayurvédica, que ainda é praticado nas comunidades hindus e inclui mais de 1500 medicamentos derivados de plantas em sua farmacopéia. Esses versos hindus mencionam a planta *Rauwolfia serpentina*, utilizada na Índia por milhares de anos no tratamento de mordidas de cobras, doenças mentais e na indução da sedação. Essa planta se tornou conhecida na medicina ocidental na metade do século XX, sendo a reserpina seu principal constituinte ativo, deprimindo a atividade do sistema nervoso central e é utilizada também no tratamento da hipertensão e esquizofrenia (SUMNER, 2000).

Em todas as partes do mundo, povos indígenas descobriram e desenvolveram o uso medicinal de plantas nativas, mas foram com as plantas utilizadas na medicina da Grécia antiga que as bases da medicina ocidental se estabeleceram (KONG et al., 2003).

A medicina tradicional ocidental teve a influência do médico grego Hipócrates (460-377 a.C.), que acreditava que as doenças eram o resultado de um desequilíbrio dos humores corporais (SUMNER, 2000). Desse modo, Hipócrates desmistifica a crença de que as doenças e as curas eram responsabilidade dos Deuses. Ele afirmava que se tratavam, na verdade, de fenômenos

naturais, passíveis de serem observados e estudados (YAMADA, 1998). Hipócrates catalogou e empregou centenas de drogas de origem vegetal (CARVALHO, 2004).

Theophrastus (371-287 a.C.), considerado “o pai da botânica”, foi estudante de Platão e Aristóteles e escreveu extensivamente sobre plantas. Ele determinou as peculiaridades e qualidades médicas das ervas, observando cuidadosamente os aspectos farmacêuticos e farmacológicos da mirra, do incenso, da cássia, mentrasto, da beladona, do timo, etc. Seu trabalho *Historia Plantarum* englobava a coleta e o preparo de plantas medicinais, condimentos e perfumes e foi utilizado como uma confiável fonte de referência durante 2000 anos (SUMNER, 2000). Na verdade, seus trabalhos, independentes de considerações metafísicas, até hoje, influenciam na atividade farmacêutica (CARVALHO, 2004).

Com o declínio da cultura grega, durante o Império Romano, os tratamentos voltaram mais uma vez a ser uma mistura temerária de magia e religião. Mas as escrituras romanas também influenciaram o desenvolvimento da medicina ocidental (KONG et al., 2003).

Com a ascensão de Roma, muitos médicos gregos migraram para o império romano. Muitos dos conhecimentos de Hipócrates foram esquecidos, contudo quando Júlio César decretou que os médicos gregos seriam reconhecidos como cidadãos romanos (46a.C.), as plantas adquiriram grande respeito (SUMNER, 2000).

Foi somente com os estudos de Pedanios Dioscórides (40-90dC), durante o reinado de Nero, que foi observado um avanço no estudo das plantas medicinais (YAMADA, 1998). As propriedades, usos e cultivos de 600 plantas medicinais foram reunidos no *De Materia Medica* no primeiro século depois de Cristo. Apesar de ter nascido na Grécia, Dioscórides foi um médico militar romano e nas suas viagens com o exército teve a oportunidade de entrar em contato com muitas plantas medicinais (KONG et al., 2003). Viajando como cirurgião junto com o exército de Nero, ele pôde espalhar suas experiências com as plantas medicinais européias. Dioscórides

defendeu o uso do salgueiro no tratamento da gota, prática que seria utilizada para o tratamento da dor nos próximos séculos, renunciando o uso da aspirina que seria lançada em 1899 pela companhia alemã Bayer. De Materia Medica foi usado como fonte de referência nos próximos 15 séculos, sendo considerado uma referência-padrão na Idade Média, época em que os médicos adquiriram pouco conhecimento adicional sobre plantas medicinais (SUMNER, 2000). Essa obra é considerada a fonte mais importante de ensinamentos de que dispomos sobre os vegetais utilizados na Antigüidade (TOUWAIDE, 1995).

Logo depois, surge Galeno (130 - 201 d.C.), que iniciou sua carreira como médico em uma escola de gladiadores. Ele conhecia um grande número de plantas medicinais, a partir das quais preparava seus remédios (PLANTAS MEDICINAIS, 2004). Ele encorajava técnicos romanos a verificarem os remédios e confirmarem se continham realmente o que estava indicado, iniciando o conceito de controle de qualidade (YAMADA, 1998). Para Galeno, a doença é resultado de uma perturbação que afeta o funcionamento dos diversos componentes do corpo. As doenças provêm do desequilíbrio dos seus elementos líquidos, isto é, os humores: sangue, linfa, bile e atrabile. Esses humores eram associados aos quatro elementos da natureza: fogo, terra, água e ar. Os diversos medicamentos eram utilizados em função do temperamento dos doentes que, assim, teriam necessidade de substâncias quentes ou frias (CARVALHO, 2004). Nessa época, também surgiram complicadas misturas de ervas, conhecidas como galênicas, que nada mais eram do que reproduções das primitivas misturas gregas e egípcias. Acredita-se que muitos documentos antigos foram perdidos durante o incêndio da Biblioteca de Alexandria (391 d.C.) (YAMADA, 1998).

Durante a Idade Média, quando o progresso da ciência empírica foi mínimo, as escolas árabes conseguiram preservar parte dos antigos textos, possibilitando que seus conteúdos fossem passados para o ocidente. No século VII, os árabes dominavam grande parte do mundo civilizado

e se interessavam pelas culturas dos povos derrotados por eles. Fundaram hospitais e bibliotecas, dominavam o comércio e assim, muitas drogas novas como o ruibarbo, a cânfora, o sene, o sândalo, a noz moscada, o tamarindo, o cravo da Índia e o âmbar foram importadas, enriquecendo o arsenal terapêutico existente (CARVALHO, 2004).

O desenvolvimento da medicina restringia-se aos persas e árabes, mas os pensamentos de Galeno e Hipócrates foram mantidos. O resultado da medicina greco-islâmica foi então descrito na *Canon Medicinae*, enciclopédia escrita no século XI por Ibn Sina, médico conhecido por Avicena. Essa obra foi repassada ao Ocidente e tornou-se a base fundamental do tratamento médico no final da Idade Média (YAMADA, 1998).

Além disso, os manuscritos que continham informações sobre plantas medicinais foram copiados e preservados nos mosteiros durante toda a Idade Média (HISTORY OF BOTANICAL, 2003). Os monges conheciam muitas obras herdadas da Antigüidade, contudo o seu saber tinha muito de empirismo. Havia numerosos mosteiros, sobretudo os dos monges beneditinos, que trouxeram da Itália a horticultura romana e a difundiram por toda a Europa. Muitos medicamentos, nessa época, eram preparados por cozimento ou por maceração (CARVALHO, 2004).

Contudo, mais de seis séculos foram necessários para que a pesquisa científica e os escritos médicos fossem restabelecidos. Durante todo esse tempo, a maioria da população ainda dependia de rituais e magia. Com o Renascimento, houve um estímulo ao pensamento científico. A prensa permitiu que o conhecimento fosse retirado dos confins das clausuras e divulgado (YAMADA, 1998).

Após a chegada de Cristóvão Colombo à América, muitas plantas do Novo Mundo tornaram-se disponíveis aos europeus (KONG et al., 2003). Durante esse período, começou a chegar à Europa uma quantidade de drogas até então desconhecidas: bálsamo do Peru, elemi,

ipecaca, salsaparrilha, coca, hamamelis, tabaco, guaiaco, sassafrás, condurango, quina, cápsico e baunilha. A madeira do guaiaco, também conhecida como “pau-santo”, era considerada um remédio eficaz contra a sífilis, doença que se espalhava na época (CARVALHO, 2004).

No reinado de Henrique VIII na Inglaterra (1491-1547), foi desenvolvido um sistema medicinal europeu ou ocidental que misturava o uso de plantas e astrologia. Por séculos, a medicina no Ocidente significou medicina baseada em plantas (KONG et al., 2003).

Ao redor de 1545, surgia na Europa o primeiro jardim destinado exclusivamente ao estudo e à produção de plantas medicinais, na Escola Médica de Pádua, na Itália. No final do século XVI, esses jardins encontravam-se distribuídos por toda a Europa (YAMADA, 1998).

No século XVII, o botânico inglês Robert Tumer escreveu: "Deus imprimiu nas plantas, ervas e flores hieróglifos que são de certa forma a própria assinatura de suas virtudes". Segundo a Teoria das Assinaturas, que se manteve durante muito tempo, as formas das raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes correspondem, de algum modo, à doença que são capazes de curar (CARVALHO, 2004).

É importante ressaltar que em outras partes do mundo as plantas medicinais também eram consideradas elementos fundamentais, principalmente nos sistemas médicos indígenas. Por exemplo, no noroeste da Amazônia, povos indígenas utilizavam pelo menos 1300 espécies de plantas (KONG et al., 2003).

William Withering foi a primeira pessoa da área médica a investigar cientificamente um remédio popular. Seus estudos (1775-1785) sobre o uso da dedaleira (*Digitalis purpurea*) no tratamento da falência cardíaca congestiva, fixaram um padrão para a química farmacêutica (KONG et al., 2003).

Finalmente, no final do século XVIII, o progresso rápido das ciências modernas veio enriquecer e diversificar em proporções extraordinárias os conhecimentos sobre as plantas (CARVALHO, 2004).

A Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica contribuíram para a preferência de uso de produtos sintéticos no tratamento farmacológico. As razões para tal preferência podiam ser explicadas devido a três motivos principais: compostos puros são facilmente obtidos, modificações estruturais produziam medicamentos mais ativos e seguros e o poder econômico das companhias farmacêuticas estava aumentando (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

Com o progresso do conhecimento científico ocorre uma divisão entre a medicina baseada no uso de plantas medicinais e os médicos regulares. No século dezenove, cientistas começaram a purificar os extratos ativos das plantas medicinais. Friedrich Serturmer isolou a morfina da *Papaver somniferum* em 1806. Devido ao aumento do conhecimento das substâncias químicas ativas, a primeira droga sintética baseada em um produto natural foi formulada em meados do século dezenove. Em 1839, o ácido salicílico foi identificado como substância ativa em várias plantas conhecidas por suas ações analgésicas, e foi pela primeira vez sintetizado em 1853, levando ao desenvolvimento da aspirina, que ainda é o medicamento sintético mais utilizado atualmente (KONG et al., 2003).

Na sociedade industrializada ocidental, os medicamentos de origem vegetal foram considerados uma opção para pessoas com pouca educação, com baixo poder econômico ou ainda simplesmente uma superstição religiosa (RATES, 2001).

Desse modo, pode-se concluir que o uso de medicamentos tem início em tempos imemoráveis. Ocorre desde a época em que o homem primitivo recorria ao mundo ao seu redor na tentativa de obter medicamentos que poderiam aliviar a dor e curar doenças. Portanto, o

estudo dos medicamentos se desenvolve conjuntamente com a evolução científica e o progresso social (DE PASQUALE, 1984).

O conhecimento de que as plantas vêm sendo utilizadas como medicamentos há tanto tempo não é uma surpresa, pois as doenças são tão antigas quanto a humanidade e é sabido que primatas não humanos como chimpanzés consomem plantas com propriedades medicinais (SUMNER, 2000).

A arte dos benzedores, curandeiros e xamãs, herdada dos magos e feiticeiras do passado, pode ser vista hoje, sendo testada cientificamente. Os laboratórios passaram a avaliar experimentalmente a veracidade dessas informações, tendo o objetivo de descobrir novos medicamentos, com base justamente nos conhecimentos que foram adquiridos durante milhares de anos e repassados de geração em geração por aqueles que são os ancestrais da ciência moderna (DI STASI, 1995).

Atualmente, sabe-se que o poder das plantas é, na verdade, proveniente da sua composição e das características das substâncias que sintetizam. Entretanto, muito tempo se passou até que se reconhecesse a verdadeira origem do poder das plantas (YAMADA, 1998).

A prática milenar de utilização de plantas medicinais ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz (DI STASI, 1995). Na Tabela 1 pode ser observada a forma de utilização das plantas medicinais através dos tempos.

FINALIDADE	VEGETAIS
Exorcismos/conjuros	Alho, tabaco, coca, ginseng, mandrágora
Defumadores	Goma, mirra, incenso, resina-de-cedro
Embalsamento	Láudano
Juízos divinos	Fava-de-calabar
De alerta	Mate
Óleo sacro	Azeite de oliva
Especiarias	Canela, cravo, cebola, alho, açafraão, pimenta
Mastigatórios	Coca, tabaco
Para fumar	Tabaco, maconha, ópio
Veneno para flecha	Curare

**Tabela 1:** Uso dos vegetais através dos tempos (CARVALHO et al., 2004).

Recentemente, tem havido um crescente interesse por terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas. Esse interesse por medicamentos de origem vegetal pode ser explicado por vários motivos, entre eles, a ineficiência da medicina convencional, devido aos efeitos colaterais dos medicamentos ou à terapia ineficaz. O uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, resultando novamente em efeitos colaterais ou outros problemas, também pode ser considerado outro motivo. Além disso, uma grande porcentagem da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional. Atualmente, não se pode deixar de mencionar que a medicina popular e a consciência ecológica sugerem que produtos naturais são menos prejudiciais. Contudo, é preciso dizer que o uso dessas substâncias não é sempre autorizado pelas autoridades legais devido à falta de comprovações de eficácia e segurança, de qualidade na produção, no comércio e na prescrição (RATES, 2001).

Nos dias atuais, nota-se um crescente retorno à vida natural. Aumenta o número de indivíduos que passam a adotar uma alimentação integral. Cresce a prática de antigas filosofias orientais, além da utilização da homeopatia, acupuntura e aromaterapia. Além disso, cada vez

mais as pessoas procuram tratamentos alternativos a fim de manter ou recuperar a saúde. É importante ressaltar que esses tratamentos não visam substituir a medicina acadêmica, mas sim complementá-la, possibilitando uma ampliação dos recursos terapêuticos (YAMADA, 1998).

Existe hoje um interesse renovado na investigação de plantas medicinais. A procura de compostos medicinais úteis é o objetivo de companhias farmacêuticas e instituições de pesquisa (KONG et al., 2003).

As plantas sempre supriram a humanidade com as curas para as enfermidades, desde o alívio de dores de cabeça até o tratamento de doenças cardíacas. O impacto dos medicamentos à base de plantas na história humana tem sido notável. As plantas medicinais são o alicerce e o futuro da medicina humana (SUMNER, 2000).

## **1.2. O potencial das plantas medicinais e da fitoterapia**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o termo “planta medicinal” é definido como sendo toda planta, cultivada ou não, que é utilizada para propósitos médicos (WHO, 2004).

Contudo, uma descrição mais detalhada diz que o termo plantas medicinais refere-se única e exclusivamente às espécies vegetais que, durante séculos, foram sendo incorporadas à cultura de todos os povos graças a suas potencialidades terapêuticas. Após estudos criteriosos, representam uma fonte inesgotável de medicamentos aprovados e comumente utilizados, bem como uma rica fonte de novas substâncias com atividade biológica potencial (DI STASI, 1995).

O potencial das plantas como fonte de medicamentos é pouco explorado. É estimada a existência de 250.000 a 500.000 espécies de plantas no mundo, sendo que o estudo fitoquímico foi realizado em apenas uma minúscula parcela. A análise fitoquímica de uma planta pode revelar

apenas uma pequena porcentagem de seus constituintes, uma vez que as plantas contêm centenas ou milhares de metabólitos (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

As plantas produzem mais de 100.000 produtos naturais de baixo peso molecular, também conhecidos como metabólitos secundários. Os produtos do metabolismo secundário são diferentes daqueles do metabolismo primário, uma vez que eles geralmente não são essenciais para os processos metabólicos básicos das plantas. Essa rica diversidade é em parte o resultado de um processo evolutivo que buscou a conquista ou a melhoria do sistema de defesa contra ataques microbianos ou destruição por insetos e animais (DIXON, 2001). Geralmente esses metabólitos secundários estão confinados a um grupo particular de organismos, ou a uma única espécie, ou ainda a uma simples variedade que cresce sob certas condições. Na maioria dos casos, não é conhecido exatamente o papel biológico que esses compostos possuem, exceto que eles representam um tesouro químico interessante, o qual devidamente estudado, pode ser benéfico para a humanidade (CANNELL, 1998).

Atualmente, existem duas opiniões opostas sobre a maneira adequada de escolher plantas medicinais a serem pesquisadas. Uma admite que a resposta será obtida preferencialmente através do conhecimento popular, por meio do acúmulo do conhecimento transmitido por gerações. A outra, indica que resultados definitivos vão depender do progresso dos procedimentos técnicos de extração, identificação e bioensaios dos compostos naturais. Apenas uma base científica é capaz de integrar essas duas visões, isto é, o conhecimento popular e o técnico. O grande desafio é unir conhecimento etnobotânico e científico ao nível da linguagem químico-biológica na procura dos padrões de funcionamento da natureza (GOTTLIEB e BORIN, 2002).

Nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 25% das prescrições contêm compostos originados de substâncias vegetais. É possível ainda dizer que mais de 74% das denominadas drogas vegetais ou fitoterápicas foram descobertas baseadas em seu histórico uso

tradicional (YAMADA, 1998). O conhecimento sobre as plantas medicinais representou e ainda representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (DI STASI, 1995).

A população, de maneira geral, acredita que medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais importantes por serem obtidos de fontes naturais. Contudo, estudos clínicos recentes mostram que essa é uma falsa premissa. Muitas plantas possuem constituintes extremamente tóxicos, como por exemplo, os glicosídeos digitálicos (YUNES e CALIXTO, 2001).

Relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para fins medicinais (FETROW e AVILA, 2000). Contudo, a maioria das espécies de plantas não foi investigada tanto química quanto biologicamente com grandes detalhes, apesar de todas as poderosas técnicas analíticas disponíveis. Mesmo as plantas bem analisadas requerem estudos clínicos adicionais (PHILLIPSON, 2003). Como exemplo, pode ser citado um estudo feito pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA, entre os anos de 1957 e 1981. Nesse estudo foram analisadas cerca de 20.000 espécies de plantas da América Latina e Ásia na procura de plantas com atividade anti-tumoral, porém não foi pesquisado se tais plantas possuíam qualquer outra atividade farmacológica (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

Apesar de muitas substâncias sintéticas terem sido produzidas, ainda existe um número relativamente grande de produtos naturais e seus derivados na lista dos medicamentos mais vendidos (SEIDL, 1999). Cerca de 25% dos medicamentos prescritos ao redor do mundo vêm das plantas, sendo que 121 compostos ativos estão em uso atualmente. Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente originados de plantas e um número significativo são medicamentos sintéticos obtidos de precursores naturais. Estima-se que 60% dos medicamentos anti-tumorais e anti-infecciosos que estão no mercado ou estão passando

por triagem clínica são de origem natural (SHU, 1998). Exemplos de importantes medicamentos obtidos de plantas podem ser observados na Tabela 2.

<b>MEDICAMENTOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE PLANTAS</b>		
<b>MEDICAMENTO</b>	<b>USO MÉDICO</b>	<b>PLANTA</b>
aspirina	analgésico, antiinflamatório	<i>Filipendula ulmaria</i>
atropina	dilatador de pupila	<i>Atropa belladonna</i>
benzoína	desinfetante oral	<i>Styrax tonkinensis</i>
cafeína	estimulante	<i>Camellia sinensis</i>
codeína	analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i>
digoxina	fibrilação atrial	<i>Digitalis purpurea</i>
eugenol	dor de dente	<i>Syzygium aromaticum</i>
hiosciamina	anticolinérgico	<i>Hyoscyamus niger</i>
morfina	analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
papaverina	antiespasmódico	<i>Papaver somniferum</i>
pilocarpina	glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
quinina	profilaxia da malária	<i>Cinchona pubescens</i>
reserpina	anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i>
escopolamina	distúrbios do movimento	<i>Datura stramonium</i>
toxiferina	relaxante em cirurgias	<i>Strychnos guianensis</i>
xantotoxina	vítigo	<i>Ammi majus</i>

**Tabela 2:** Exemplos de alguns medicamentos obtidos a partir de plantas (MANS et al., 2000).

Por volta de 1970, a OMS reconhece o valor das plantas medicinais, considerando os promissores e consagrados resultados da medicina tradicional chinesa (YUNES e CALIXTO, 2001).

O uso de terapias complementares e alternativas tornou-se um fenômeno muito difundido atualmente, não podendo ser ignorado. Dentre todas as terapias complementares ou alternativas disponíveis, a Fitoterapia - prática do uso de plantas ou suas partes com finalidade terapêutica - vem-se impondo e já não pode mais ser considerada um simples modismo. Entre os pacientes que procuram profissionais de saúde da escola convencional, um terço utiliza fitoterápicos, embora muitos deixem de revelar esse dado a seu médico (FETROW e AVILA, 2000).

O princípio da Fitoterapia está baseado na alopatia, diferenciando-se apenas pelo uso de preparados tradicionais padronizados, eficazes, com inocuidade e qualidade controladas, elaborados de plantas medicinais e não de substâncias quimicamente definidas, isoladas, purificadas e de estrutura molecular determinada. Em contra partida, a Fitoterapia acaba se aproximando da homeopatia, devido ao aspecto de utilizar produtos de origem natural e muitas vezes de tinturas padronizadas de plantas medicinais (DI STASI, 1995).

A Fitoterapia vem sendo utilizada há muito tempo e seu uso generalizou-se em todos os quadrantes do mundo. Em 1997, a indústria de produtos fitoterápicos vendeu 3,2 bilhões de dólares e continua tendo um crescimento anual de 25% (FETROW e AVILA, 2000).

Enquanto a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco envolve investimentos muito altos, cujo custo de pesquisa varia entre 300 a 500 milhões de dólares, o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido com custos muito menores (YUNES et al., 2001).

A Fitoterapia, em especial, ganha destaque valorizando o fitocomplexo, um conjunto de vários princípios ativos que atuam sinergicamente. O mecanismo de ação terapêutica é mais lento, e chega a ser considerado por alguns autores como mais fisiológico e natural (YAMADA, 1998).

Apesar de a Fitoterapia ser utilizada em todas as partes do mundo, sem dúvida, a Alemanha é reconhecidamente a nação que mais incentivou o seu uso. De acordo com estimativas recentes, esse país liberou 700 produtos fitoterápicos para comercialização em seu território. Atualmente, 70% dos profissionais de saúde alemães prescrevem fitoterápicos a seus pacientes, e ao mesmo tempo, mantêm um dos maiores mercados mundiais desses produtos (FETROW e AVILA, 2000).

### **1.3. As plantas medicinais e a Fitoterapia no Brasil**

O Brasil possui cerca de 22% das plantas superiores existentes no planeta (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996). Cerca de 20% da nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis e o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1995). Essa não é uma situação que ocorre apenas no Brasil, pois aproximadamente 70 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem parcial ou totalmente de medicamentos à base de plantas (WIJESEKERA, 1991).

O uso de plantas medicinais na América do Sul contribui significativamente nos tratamentos de saúde e no Brasil, muitas plantas são utilizadas na forma de extratos, emplastos e infusões, sem qualquer evidência científica que comprove a eficácia desses tratamentos (HOLETZ et al., 2002).

A Fitoterapia vem crescendo muito nos últimos anos. Dentro dessa perspectiva, poderíamos esperar que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora, que detém aproximadamente um terço da flora mundial. Além disso, existe no país um grande número de grupos de pesquisa que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, da quimiotaxonomia, da farmacologia de produtos naturais e de outras áreas relacionadas. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al., 2001).

Quinto maior consumidor mundial de remédios, o Brasil nunca desenvolveu um medicamento. O mercado brasileiro é dominado por companhias farmacêuticas multinacionais

que investem em pesquisa e tecnologia, competindo fortemente num mercado bilionário, cujas cifras são da ordem de US\$ 200 bilhões ao ano (CALIXTO, 1996).

Infelizmente, a situação da maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria brasileira está fundamentada somente no uso popular das plantas sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica. Não podendo, portanto, ser competitivos nacional e muito menos internacionalmente. Deve ser somado a essa situação, o fato de que existe a falta de uma política definida, permanente e comprometida com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, especialmente a fitofarmacêutica nacional, por parte das autoridades responsáveis no Brasil. Essa situação poderá levar ao desaparecimento das indústrias nacionais de fitoterápicos (YUNES et al., 2001).

Contudo, a indústria farmacêutica ainda tem uma oportunidade no Brasil. Os fitofármacos fazem parte de um mercado em expansão e exibem cifras igualmente consideráveis: US\$ 40 bilhões ao ano. O Brasil tem condições de participar de forma considerável desse mercado, principalmente devido à sua vasta biodiversidade e à tradição no uso de plantas medicinais. O nosso país é capaz de aliar tecnologia e competência e, desse modo, criar uma excelente oportunidade de impulsionar a indústria farmacêutica nacional. O desenvolvimento de medicamentos proveniente de plantas medicinais é geralmente mais rápido e envolve custos menores se comparados com os obtidos por síntese. Além disso, no caso brasileiro, a matéria-prima já existe. Só falta dar ao produto a garantia da ciência (CALIXTO, 1996).

É importante dizer também que o Brasil é dotado de outra riqueza além da natural. Trata-se de nosso patrimônio étnico-cultural. Além das nações indígenas, nosso povo é formado por imigrantes europeus, asiáticos e africanos numa miscigenação ímpar que somente encontra paralelo nos Estados Unidos da América. O Brasil possui uma grande diversidade cultural de onde pode derivar uma maior quantidade de informações etnofarmacológicas. A sabedoria dos

povos indígenas, somada àquela trazida pelos imigrantes e ao saber desenvolvido aqui pelo homem amazônico, pantaneiro, do cerrado, do pampa, litorâneo e até mesmo urbano fornece indicações e pistas que podem abreviar enormemente a distância entre a planta e o medicamento. Os medicamentos podem então ser desenvolvidos no Brasil, com indústrias brasileiras patrocinando cientistas e investigadores clínicos brasileiros e apresentando resultados bastante competitivos no mercado farmacêutico mundial (FITOMEDICAMENTOS..., 2004).

Não podemos esquecer ainda que das 350 mil espécies de plantas que existem catalogadas em todo o mundo, cerca de 60 mil estão no Brasil. Certamente, devido a esse fato, o Brasil é um alvo de interesse internacional para o próximo século (CALIXTO, 1996).

#### **1.4. O sistema imunológico**

O sistema imunológico evoluiu nos vertebrados para protegê-los de microorganismos patogênicos invasores e do câncer. É capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem especificamente reconhecer e eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores. Estas células e moléculas agem conjuntamente em uma rede dinâmica primorosamente adaptável, cuja complexidade somente se assemelha à do sistema nervoso (GOLDSBY et al., 2000).

Os macrófagos são células que participam de diferentes processos no organismo, como por exemplo, remodelagem tecidual durante a embriogênese, reparação de ferimentos, remoção de células velhas e danificadas, hematopoiese e homeostase (KLIMP et al., 2002). Essas células têm um papel central no sistema imunológico, defendendo o hospedeiro contra microorganismos. A seqüência clássica de diferenciação do sistema mononuclear fagocitário segue de promonoblasto para monoblasto, promonócito, monócito e macrófago maduro. Todos estes tipos

morfológicos são encontrados na medula óssea, sendo que os monócitos são liberados na corrente sanguínea e, então, se disseminam para todos os tecidos (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994).

Além disso, os macrófagos estão envolvidos em todas as fases da resposta imune (ROITT et al., 1999). Possuem mecanismos para reconhecer e reagir a patógenos, o que os torna células importantes da imunidade inata. Eles também cooperam com os linfócitos para desenvolver respostas imunes adaptativas (PARHAM, 2001).

Toda vez que se deparam com certos estímulos, os macrófagos sofrem um processo de ativação, caracterizado por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Os macrófagos ativados, porém, não funcionam apenas como fagócitos. Essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio, citocinas, etc (PARSLOW et al., 2000). São importantes como células inflamatórias, tumoricidas e microbicidas, pois a destruição de muitos parasitas intracelulares e de algumas células tumorais requer a ativação de macrófagos (ROITT et al., 1999).

Os radicais derivados do oxigênio liberados pelos macrófagos são capazes de oxidar membranas celulares e também de formar pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais, levando à morte da bactéria (IMUNOHEMATOLOGIA, 2002).

Muitos aspectos da fisiologia dos macrófagos são influenciados de alguma forma pelo lipopolissacarídeo (LPS), um produto das bactérias Gram-negativas. O LPS induz um aumento do consumo de glicose e oxigênio e a célula adquire a capacidade de matar microorganismos e células tumorais. Os macrófagos também desenvolveram um mecanismo refinado para reconhecer LPS no ambiente e, portanto ele é um dos mais potentes estimuladores de macrófagos. Em muitos casos, apenas 1pg/mL produz resposta mensurável (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994).

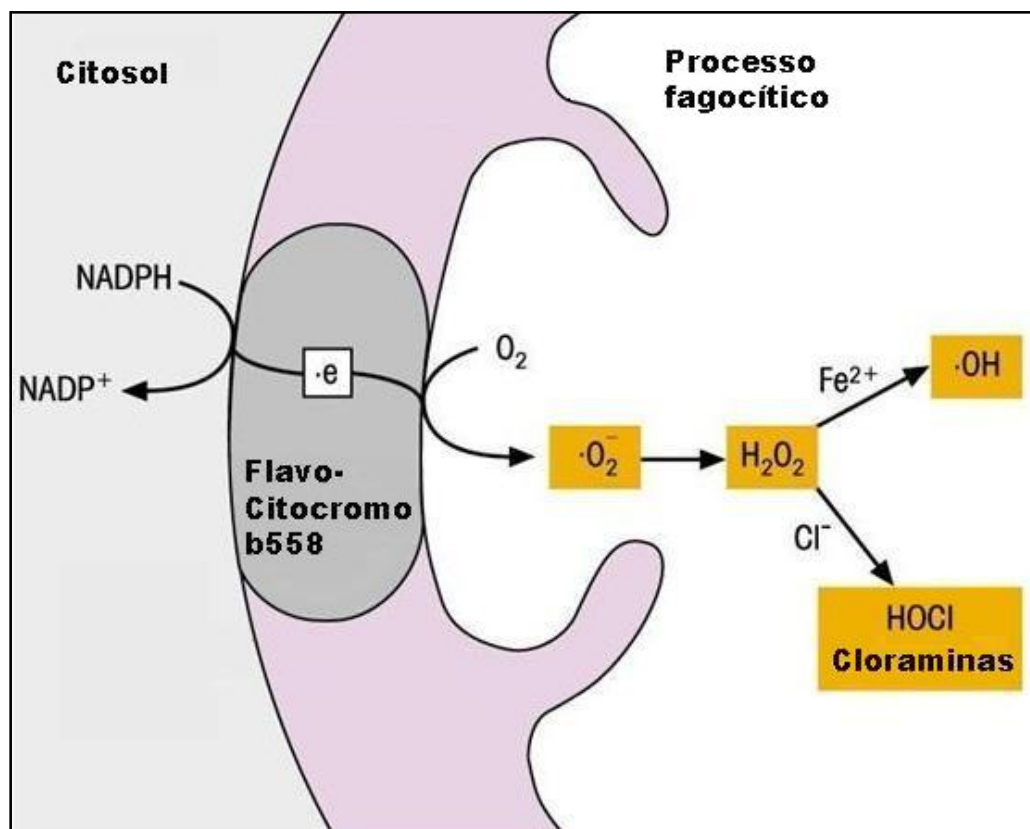
Em 1983, Mosmann desenvolveu a técnica colorimétrica utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT). Essa técnica tem sido muito empregada atualmente para avaliar a viabilidade celular, inclusive de macrófagos colocados em contato com extratos, frações e substâncias puras obtidos de espécies vegetais (AUTORE et al., 2001; DIRSCH et al., 1998; KOBUCHI et al., 1997; OH et al., 2002; PAE et al., 2003; SHIN et al., 2004; TEZUKA et al., 2001, WANG et al., 2002). A metodologia é baseada na redução de um sal de tetrazólio amarelo solúvel por enzimas microsomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Essa redução gera a formazana, um produto insolúvel de cor púrpura que se acumula nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. A adição do álcool isopropílico solubiliza e libera a formazana produzida, possibilitando a quantificação colorimétrica. A capacidade das células reduzirem o MTT indica atividade e integridade mitocondrial e é interpretada como uma medida da viabilidade celular (BARILE, 1994; FRESHNEY, 1994; KORTING et al., 1994).

Fagócitos como neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a fagocitose ou devido à estimulação com vários agentes, através da ativação do complexo NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) oxidase (FORMAN e TORRES, 2002). O forbol miristato acetato (PMA) é um desses agentes capazes de induzir a liberação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pelos macrófagos (PICK e KEISARI, 1980).

A geração fisiológica de ERO está relacionada com diversas respostas fisiológicas, desde a ativação transcricional até a proliferação celular e apoptose (FORMAN e TORRES, 2002). Em resposta à ativação de neutrófilos e macrófagos por mediadores inflamatórios solúveis específicos e/ou particulados, é observada a ocorrência do *burst* oxidativo, que está associado com um aumento de 2-20 vezes no consumo de oxigênio e aumento do metabolismo da glicose, dependendo da célula e da natureza do estímulo (BABIOR, 1978; BEUTLER et al., 1985;

DRATH e KARNOUSKY, 1975). A produção estimulada de ERO foi nomeada de *burst* oxidativo devido ao consumo transitório de oxigênio e é considerada um evento crítico para a ação bactericida dos fagócitos (FORMAN e TORRES, 2002).

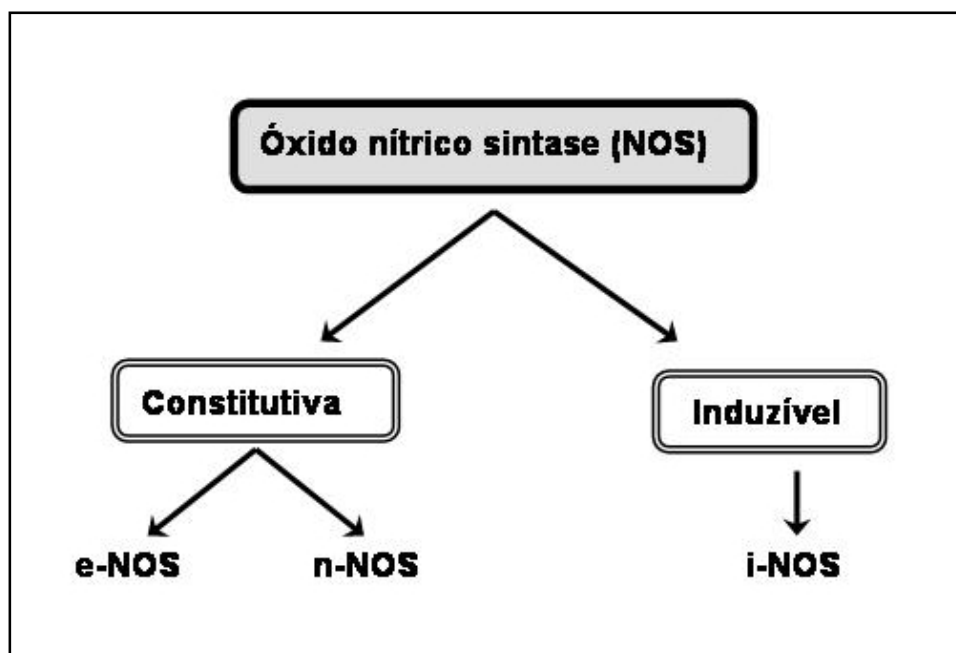
Durante o *burst* oxidativo, ocorre a redução do oxigênio ( $O_2$ ) a ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O NADPH é utilizado como doador de elétrons e a enzima flavocitocromo oxidase b558 (componente do complexo NADPH oxidase) participa da reação. O  $O_2^-$  gerado é subsequentemente convertido a  $H_2O_2$  com ajuda da enzima superóxido dismutase (SOD) (PICK e KEISARI, 1980; PICK e MIZEL, 1981; ROITT et al., 1999; ROITT e DELVES, 2001). Um esquema da produção dos intermediários reativos do oxigênio pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1:** Produção dos intermediários reativos do oxigênio, adaptado de Roitt e Delves, 2001.

O peróxido de hidrogênio possui uma variedade de papéis no corpo humano. Atua como molécula sinalizadora, é um agente citotóxico no sistema de defesa e também pode causar doenças (ABE e BRADFORD, 1999; CLEMENT et al., 1998; FORMAN e TORRES, 2001; HALLIWELL et al., 2000).

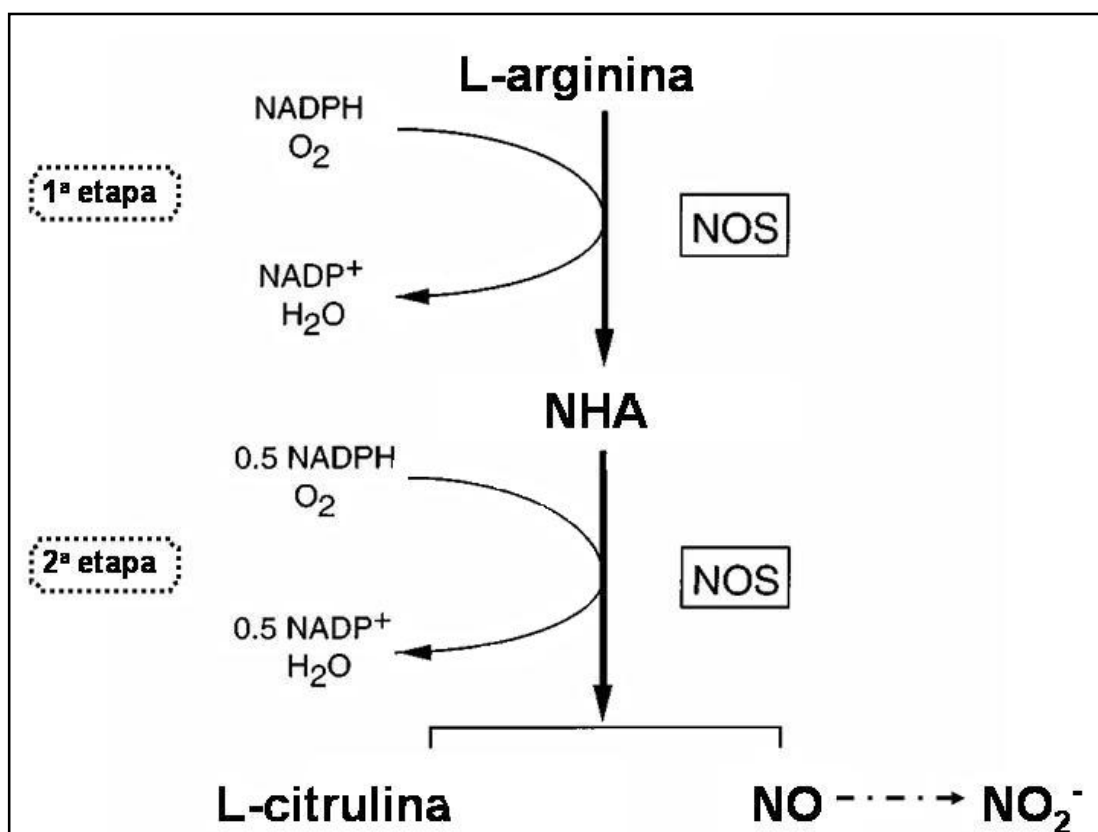
O óxido nítrico (NO) é formado através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, logo em seguida, se transforma em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Três isoformas de óxido nítrico sintase (Figura 2) foram descritas baseadas nos três diferentes genes que foram clonados e seqüenciados, na localização e na sensibilidade à estimulação pelo cálcio: duas isoformas de óxido nítrico sintase constitutivas (cNOS), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e uma óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KIECHLE e MALINSKI, 1993). Clonagem molecular revelou que essas isoformas compartilham 50-60% de homologia, sendo que cada isoforma de NOS é codificada por um gene distinto contendo 26 éxons (iNOS e eNOS) ou 29 éxons (nNOS). Sabe-se ainda que a porção C terminal da proteína NOS é semelhante à citocromo P450 redutase (HOBBS et al., 1999).



**Figura 2:** Isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) (DUSSE et al., 2003).

A c-NOS (peso molecular de 133 kDa) produz pequenas quantidades de NO, nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que é controlada pelos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  (KURO e SCHROEDER, 1995; MARLETTA, 1994; MONCADA, 1991;). Em macrófagos, a iNOS (peso molecular de 130 kDa) é cálcio independente e sua atividade é induzida por citocinas, como o fator de necrose tumoral - alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), a interleucina - 1 (IL-1) e o interferon-gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ) e também por estímulos microbianos, como o LPS (DRAPIER et al., 1988; HIBBS et al., 1992; KURO e SCHROEDER, 1995; SCHINDLER e BOGDAN, 2001). A i-NOS requer algumas horas para ser expressa, mas uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a c-NOS e a produção deste mediador continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou até ocorrer a morte celular (DUSTING e MacDONALD, 1995).

O NO é formado enzimaticamente a partir da L-arginina na presença da NOS (ACHIKE e KWAN, 2003). A síntese de NO, esquematizada na Figura 3, envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e O<sub>2</sub> e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e L-citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) são utilizados como co-fatores na reação (MARLETTA et al., 1988; MARLETTA, 1994).



**Figura 3:** Reação bioquímica que mostra a síntese de NO em células de mamíferos, adaptado de MacMicking et al., 1997.

O NO é uma molécula que possui uma grande variedade de funções (Tabela 3) e atua em muitos processos fisiológicos, entre eles na regulação do sistema imune (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; KIECHLE e MALINSKI, 1993). Além disso, essa molécula também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrada sua ação antibacteriana, antiviral e antiparasitária. Nesses casos, o NO atua em altas concentrações e é tóxico aos microorganismos invasores. Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para a ação microbicida (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

<b>VISÃO GERAL DAS FUNÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO</b>			
<b>Categorias</b>	<b>Produtores de NO (exemplos)</b>	<b>Efeitos fenotípicos do NO</b>	<b>Exemplos de mecanismos moleculares</b>
<b>Atividade antimicrobiana</b>	macrófagos microglia neutrófilos eosinófilos, fibroblastos células endoteliais e epiteliais astróglia	<b>função efetora</b> - morte ou redução da replicação dos agentes infecciosos (vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos. Morte ou inibição do crescimento das células tumorais.	- efeito direto do NO sobre o patógeno - efeitos indiretos da via da NOS (por exemplo, reação do NO com outras moléculas efetoras, depleção da arginina, etc.) - inibição de enzimas essenciais para o crescimento tumoral (por exemplo, enzimas da cadeia respiratória, cis-aconitase, ornitina descarboxilase, etc.) - inibição do crescimento através da depleção da arginina via iNOS - parada do ciclo celular – <i>downregulation</i> da ciclina D1 - indução da apoptose por ativação das caspases e acúmulo de p53 - sensibilização das células tumorais a citotoxicidade mediada por TNF- $\alpha$
<b>Atividade antitumoral</b> <b>Efeitos danosos aos tecidos (Imunopatologia)</b>	macrófagos, eosinófilos macrófagos, microglia, queratinócitos, células mesangiais, astróglia	Necrose ou fibrose do parênquima	- apoptose das células do parênquima - degradação da matriz extracelular - deposição da matriz proliferação das células mesenquimais - influxo de células inflamatórias através da regulação de quimiocinas
<b>Efeitos antiinflamatórios e imunossuppressores</b>	Macrófagos	<b>Funções imunoregulatórias</b> - inibição da: proliferação de linfócitos B e T, produção de anticorpos pelas células B CD5+, diversificação das células B e T auto-reativas - inibição do recrutamento de leucócitos (adesão, extravasamento, quimiotaxia)	- apoptose das células T ou células apresentadoras de antígeno - <i>downregulation</i> do MHC classe II, moléculas coestimulatórias e citocinas - quebra de cascatas de sinalização e fatores de transcrição. - inibição da síntese de DNA - <i>downregulation</i> de moléculas de adesão e quimiocinas
<b>Modulação da produção e função de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (efeitos pró e antiinflamatórios)</b>	macrófagos, linfócitos T células endoteliais fibroblastos	<i>Upregulation e downregulation</i> de: • IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF • TGF- $\beta$ , G-CSF, M-CSF, VEGF • MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, MCP-1	Modulação de: - cascatas de sinalização (ex.: proteína G, MAP quinases, caspases) - fatores de transcrição (NFKB, Sp-1, AP-1) - proteínas que regulam a estabilidade do mRNA ou a tradução do mRNA - enzimas que processam precursores de citocinas
<b>Desvio de células T helper</b>	macrófagos	Indução e diferenciação de células Th1 Supressão de respostas celulares Th1 (e Th2) Supressão das respostas de célula T tolerogênicas	- possível estimulação da sinalização mediada pela IL-12 - supressão da produção de IL-12

**Tabela 3:** Funções do óxido nítrico no sistema imune (BOGDAN, 2001).

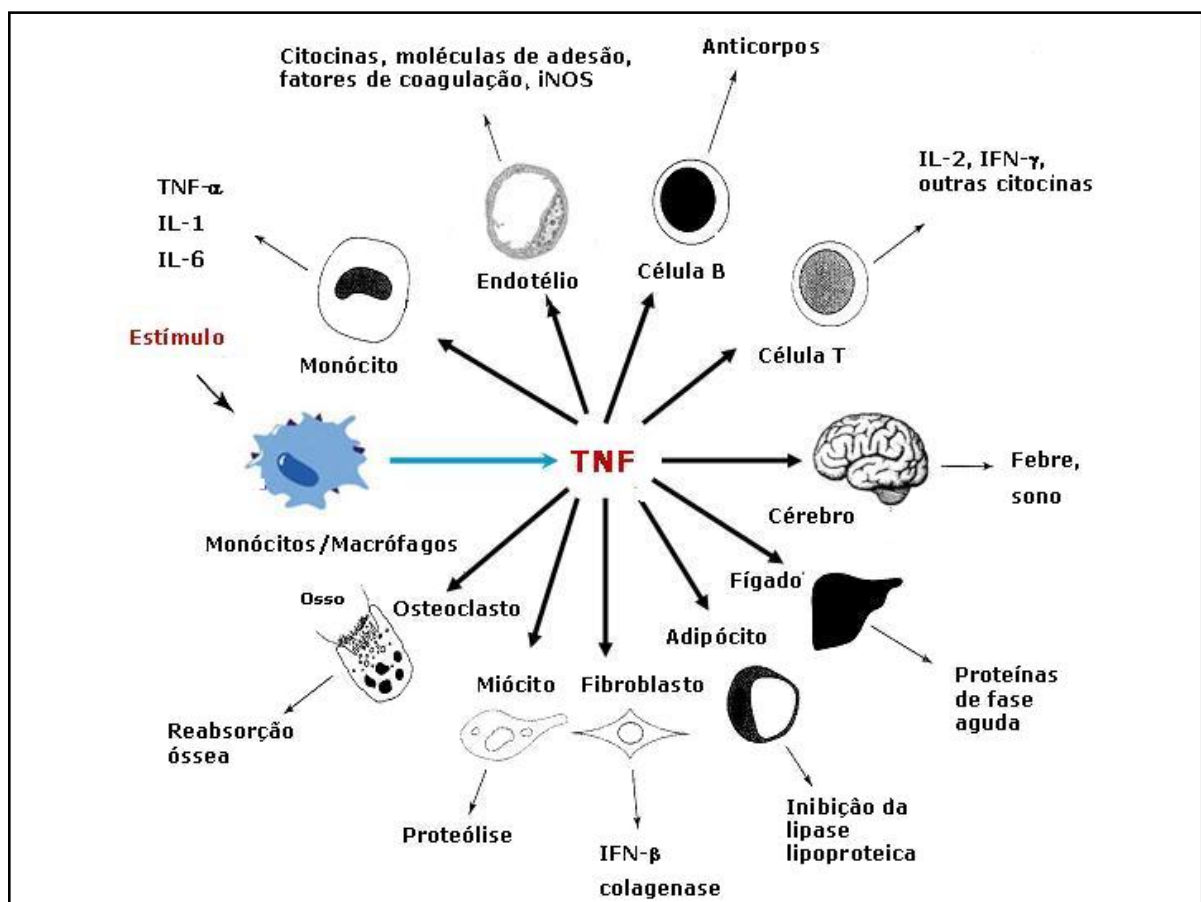
Atualmente, já está bem estabelecido que o NO tem um duplo papel no processo inflamatório. O NO secretado em altos níveis por macrófagos ativados é importante na defesa contra microorganismos e células tumorais (McMICKING et al., 1997). Por outro lado, os efeitos pró-inflamatórios do NO parecem ser mediados pela sua produção exagerada e estão relacionados a várias doenças como o choque séptico, doenças auto-imunes e cardiovasculares (DINERMAN et al., 1993; IALENTI et al., 1993; KILBOUM e GRIFFITH, 1992; MONCADA et al., 1991).

Tanto espécies reativas de oxigênio quanto espécies reativas de nitrogênio (ERN) contribuem para a fisiopatologia das doenças inflamatórias (MOILANEN e VAPAATALO, 1995). É preciso ainda lembrar que o NO pode sofrer um processo oxidativo com espécies reativas de oxigênio, formando mais intermediários ativos, como o peroxinitrito, que é capaz de reagir com a tirosina e cisteína das proteínas. A exposição prolongada a grandes quantidades de NO (como na ativação da iNOS) inibe a atividade de várias enzimas, como a aconitase, citocromo C oxidase e ribonucleotídeo redutase. Como resultado, o NO pode se tornar citotóxico ou citostático. Esta é, em parte, a base das funções fisiopatológicas do NO. Contudo, um controle apropriado da homeostase do NO faz com que esse mediador seja um sinal útil em um certo evento fisiológico ou, por outro lado, seja citotóxico devido a uma geração excessiva (ACHIKE e KWAN, 2003).

Produção de grandes quantidades de NO por macrófagos ativados contribui para a capacidade dos macrófagos suprimirem a proliferação linfocitária. Citocinas secretadas por linfócitos ativados regulam a síntese de NO pelos macrófagos. O NO tem diversos efeitos na função dos neutrófilos. Essa molécula parece mediar algumas das ações indesejáveis das citocinas pró-inflamatórias como a IL-1. Concluindo, o NO regula respostas humorais e celulares na inflamação, possuindo tanto propriedades antiinflamatórias quanto pró-inflamatórias, dependendo do tipo e da fase da reação inflamatória (MOILANEN e VAPAATALO, 1995).

As citocinas são mediadores solúveis liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário, essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também de células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994).

Dentre as citocinas, encontra-se o TNF- $\alpha$ , que foi purificada, seqüenciada e teve seu gene clonado em meados dos anos 80. Desde então, várias propriedades atribuídas a essa citocina têm sido demonstradas (EIGLER et al., 1997). É uma citocina multifuncional que possui funções centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). Exerce um papel essencial na rede de citocinas, especialmente com relação à patogênese de muitas doenças infecciosas e inflamatórias (EIGLER et al., 1997). As funções do TNF- $\alpha$  podem ser visualizadas na Figura 4.



**Figura 4:** Atividades biológicas do TNF- $\alpha$  (EIGLER et al., 1997).

O TNF- $\alpha$  é um potente mediador, com efeitos benéficos e maléficos (PARHAM, 2001). Essa citocina é certamente responsável por muitos dos exemplos de destruição de células tumorais pelos macrófagos e, junto com o IFN- $\gamma$ , é poderosamente sinérgica na destruição de tumores suscetíveis (ROITT et al., 1999).

A síntese de TNF- $\alpha$  é estimulada em monócitos/macrófagos por diferentes substâncias exógenas como LPS e  $\beta$ -glucanas, ou por mediadores endógenos como a IL-1. Altas concentrações de TNF- $\alpha$  no plasma foram demonstradas em diversas doenças inflamatórias e infecciosas, como sepse, meningite bacteriana, malária cerebral, síndrome da angústia respiratória do adulto, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e artrite reumatóide (EIGLER et al., 1997). Várias revisões sobre essa citocina têm sido descritas nos últimos anos, principalmente discutindo o seu papel nas doenças (DINARELLO et al., 1993; GIBSON, 2004; METHE et al., 2004; SCHACHNA, 2004; TRACEY e CERAMI, 1994).

Apesar de diversos tipos celulares produzirem TNF- $\alpha$ , as principais fontes dessa citocina são os monócitos/macrófagos. O TNF- $\alpha$  induz numerosas mudanças pró-inflamatórias nas células endoteliais, incluindo a produção de outras citocinas, a expressão de moléculas de adesão, a liberação de substâncias pró-coagulantes e a indução da iNOS. Essas alterações podem levar ao choque séptico. Além disso, o TNF- $\alpha$  estimula linfócitos T e B, induz a febre, estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda e ainda suprime a lipase lipoprotéica, contribuindo para a caquexia (EIGLER et al., 1997) (Figura 4).

A expressão de TNF- $\alpha$  também é dependente da ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B (EIGLER et al., 1997). O NF $\kappa$ B é um fator de transcrição que possui um papel crítico na expressão de mediadores inflamatórios. Esse fator está seqüestrado no citosol formando um complexo com seu inibidor, o I $\kappa$ B (FORMAN e TORRES, 2002). O NF $\kappa$ B apresenta uma gama

de ação maior em comparação com outros fatores de transcrição até então caracterizados. Essa superioridade é devida a variados estímulos que o ativam, bem como a inúmeros genes e fenômenos que ele regula. Entre esses estímulos estão os neurotransmissores (como o glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a b-amilóide), citocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a iNOS e a ciclooxigenase tipo 2 (COX-2). Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NFkB. A implicação desse fator de transcrição como alvo terapêutico é decorrente da variedade de genes que sofrem regulação pelo fator NF-kB, envolvidos em vários processos celulares, tais como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular. Entre tais genes, podem ser citados os envolvidos na produção de enzimas, como a iNOS, a COX-2 e a SOD, e de citocinas, como o TNF- $\alpha$  (GLEZER et al., 2000).

### **1.5. As plantas medicinais e a imunologia**

O termo imunomodulação pode ser definido como uma modificação da resposta imunológica ou da função do sistema imune, através da ação de agentes estimulantes ou supressores (IMMUNOMODULATION, 2004; MEDICAL DICTIONARY, 2004).

Sistemas biológicos, incluindo o sistema imune, mostram uma clara necessidade de regulação. Uma vez que a resposta imune é iniciada, mecanismos devem existir para controlar a extensão dos seus efeitos e regulá-la de tempos em tempos. Os chamados "modificadores da resposta biológica" constituem um grupo de agentes terapêuticos capazes de alterar as respostas

imunológicas. Apesar dos mecanismos de ação dos imunomoduladores serem supostamente muito complexos, parte de sua atividade pode ser devida a um efeito direto sobre as células imunológicas. Essa é uma possibilidade para a avaliação da potência desses agentes através de medidas da resposta celular *in vitro*. Os diferentes métodos de análise devem ser adequados para medir a supressão ou a estimulação dos sistemas celulares testados (LAWSON e BAUER, 1998). Testes *in vitro* têm sido muito úteis na avaliação da imunomodulação (AUTORE et al., 2001; LAWSON e BAUER, 1998; LU et al., 2004).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais que agem como antioxidantes e coenzimas, além de muitas outras (WILLIAMS, 2001).

Várias plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram modular a resposta imunológica (AGARWAL e SINGH, 1999), sendo que os princípios ativos dessas plantas foram isolados e caracterizados (GRAHAM et al., 2000; YAMAGUCHI, 1992).

Atualmente, as propriedades imunomoduladoras e antiproliferativas de muitas plantas medicinais estão bem determinadas (AGARWAL e SINGH, 1999; KARKABOUNAS et al., 2000; OPOKU et al., 2000). Desde muito tempo, o estudo da modulação da resposta imune tem despertado interesse como uma alternativa para o alívio de doenças (MEHROTRA et al., 2003).

Imunomoduladores são compostos que predominantemente atuam de forma não restrita no sistema de defesa. Eles têm um potencial de atividade relativamente curto. Como seus efeitos desaparecem de modo relativamente rápido, eles devem ser administrados continuamente ou em intervalos regulares. Esse é o caso, por exemplo, do polissacarídeo lentinan que está sendo utilizado para deter o crescimento de tumores (CHIHARA, 1992; LAWSON e BAUER, 1998).

Muitas plantas medicinais e medicamentos derivados de plantas mostraram possuir efeitos na via do óxido nítrico. A via de sinalização do NO tem se tornado, nesses últimos anos, um alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos. Acredita-se que o alto teor de flavonóides, catequinas, taninos e outros compostos fenólicos presentes nos vegetais, frutas, soja, chá e vinho tinto contribuam para os efeitos benéficos à saúde. Alguns desses compostos induzem a formação de NO nas células endoteliais, melhorando a circulação, enquanto que outros suprimem a indução da iNOS nas inflamações e infecções (ACHIKE e KWAN, 2003).

Triterpenos isolados da planta *Rubia yunnanensis*, conhecida na medicina chinesa como Xiao Hong Sheng, inibiram a produção de NO em macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS (MORIKAWA et al., 2003). O composto curcumina, isolado da planta *Curcuma longa*, inibiu a produção de NO e a expressão da iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (PAN et al., 2000).

Apesar de uma intervenção farmacológica na formação do NO servir como alvo terapêutico em certos estados patológicos, uma dieta apropriada com a intenção de favorecer uma homeostase positiva de NO pode também servir como uma medida preventiva para a promoção da saúde, evitando doenças. De fato, frutas, vegetais, ervas medicinais e seus componentes ativos possuem propriedades antioxidantes e exercem seus efeitos terapêuticos, pelo menos em parte, influenciando o metabolismo do NO (ACHIKE e KWAN, 2003).

Os efeitos de um polissacarídeo isolado do *Panax ginseng* foram examinados com a utilização de macrófagos peritoneais murinos. A atividade citotóxica contra células de melanoma B16 foi significativamente induzida. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram aumentados. A atividade fagocítica e a expressão de CD14 nos macrófagos foram potencializadas. Os autores sugerem que o ginseng possui efeitos

imunoestimulantes em macrófagos e essa capacidade poderia ser utilizada clinicamente no tratamento de doenças, como o câncer (SHIN et al., 2002).

Componentes polissacarídicos da *Echinacea purpurea* mostraram aumentar a produção *in vitro* de IL-1, interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e TNF- $\alpha$  por macrófagos (BURGER et al., 1997; LEUTTIG et al., 1989). Os efeitos das alquilamidas isoladas e purificadas dessa planta também foram estudados. A atividade fagocítica foi aumentada, bem como houve aumento na produção de TNF- $\alpha$  e NO após a estimulação *in vitro* com LPS (GOEL et al., 2002).

Mehrotra et al. (2003) demonstraram o potencial antiproliferativo e imunossupressor *in vitro* do extrato etanólico do rizoma de *Acorus calamus*. Neste trabalho, houve inibição da produção de NO, interleucina-2 (IL-2) e TNF- $\alpha$ , mas o IFN- $\gamma$  não sofreu alteração.

No Brasil, Santos et al. (1999) estudaram a atividade imunomodulatória do extrato aquoso da marcela (*Achyrocline satureioides*). Nesses estudos, foi observado que o extrato possui uma leve atividade imunossupressora.

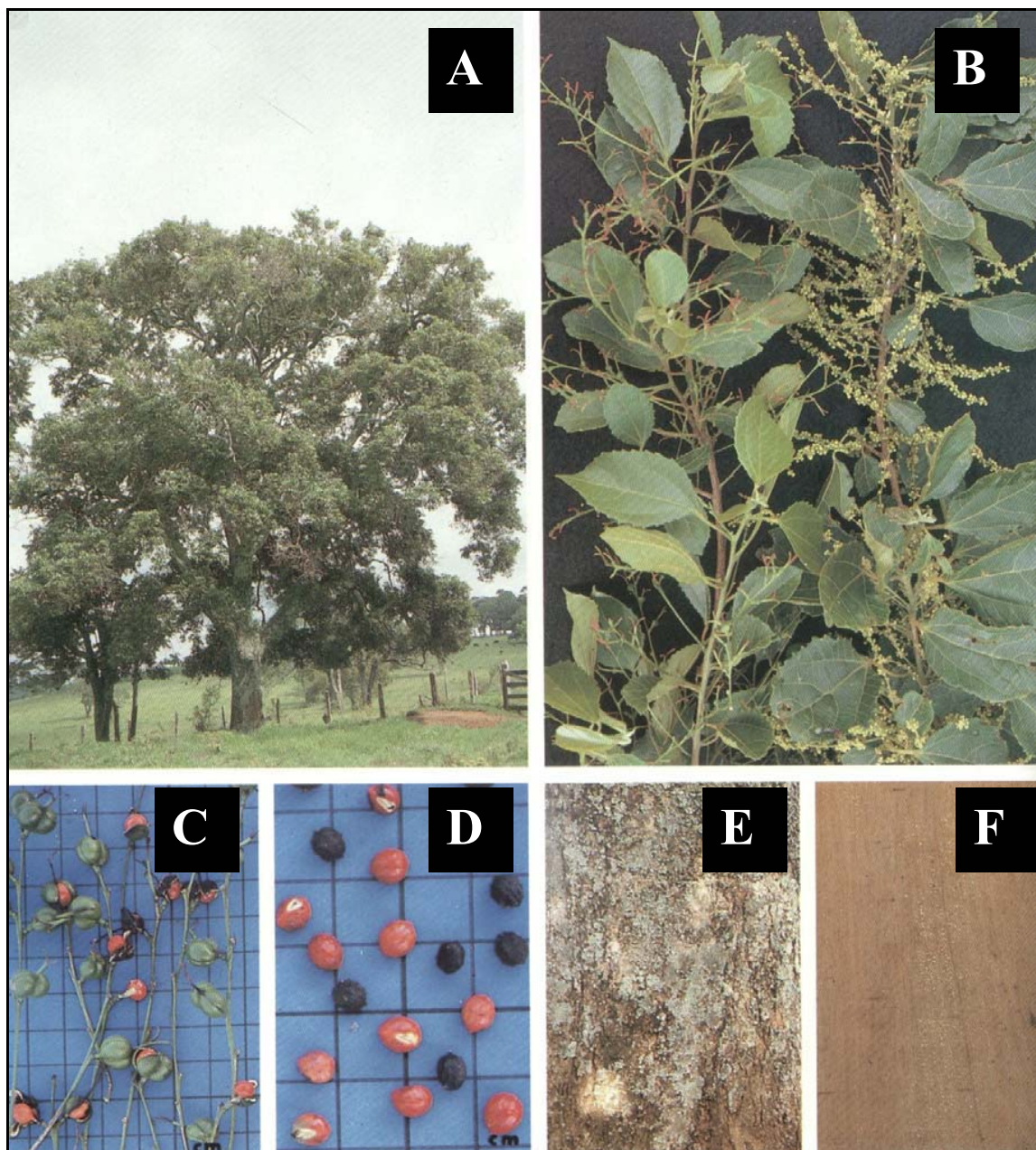
## **1.6. O gênero *Alchornea***

O gênero *Alchornea* (pertencente à família Euphorbiaceae) contém cerca de 50 espécies, cuja distribuição geográfica abrange a região tropical da América, África e Ásia. Dentre essas espécies, cerca de dez ocorrem na América Central e América do Sul. A *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Müll. Arg. é a espécie de maior distribuição geográfica. Na Floresta Estacional Semidecidual e, com menor intensidade na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), há duas outras espécies simpátricas de ocorrência comum, sendo uma delas a *Alchornea glandulosa*

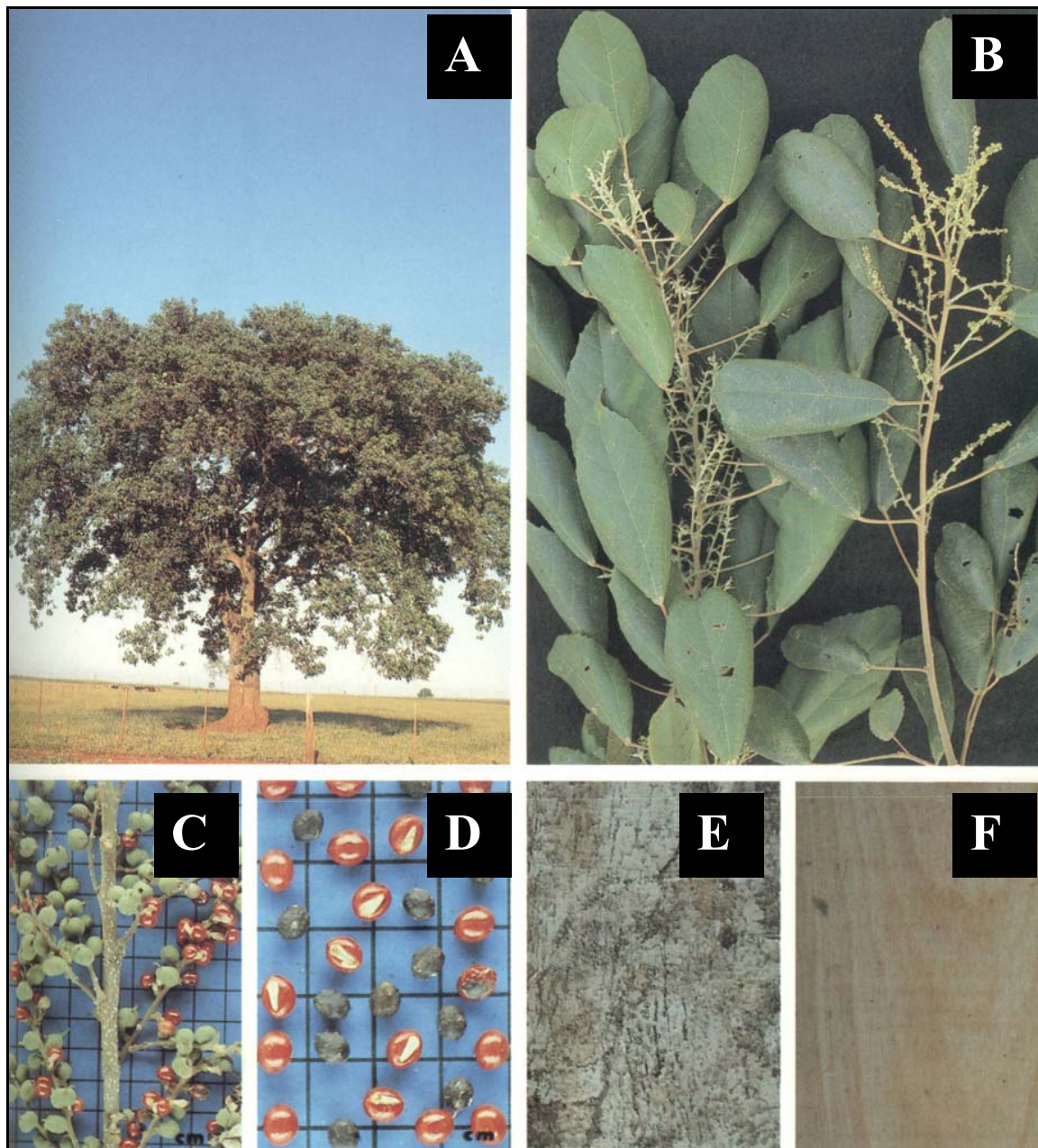
Poepp. Essa espécie se diferencia da *A. triplinervia* por possuir uma copa mais densa, de cor verde-clara, muito característica (CARVALHO, 1994).

A *Alchornea triplinervia* é uma árvore semicaducifólia, de 15 a 30m de altura com folhas simples, basicamente elípticas ou arredondadas de 3 a 6cm de comprimento. Possui flores de cor creme e seus frutos são arredondados, tendo de 5 a 11 mm de diâmetro. Essa espécie floresce nos meses de outubro e novembro. É conhecida também como tapiá, alcórnea, caixeta-branca, canela-samambaia, malacaxeta, tamanqueira, tapiazeiro e tapiá-guaçu-branco (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1992). No Brasil, a *A. triplinervia* está presente em vários estados como Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, etc (CARVALHO, 1994) (Figura 5).

A *Alchornea glandulosa* é uma espécie dióica, com cerca de 10 a 20m de altura, e que no Brasil está distribuída do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. É perenifólia, heliófila, pioneira, freqüente em beiras de rios e em planícies aluviais da Floresta Pluvial Atlântica. Possui folhas simples, recurvadas nos bordos com 8-16cm de comprimento. Os frutos amadurecem de setembro a outubro e de dezembro a janeiro (LORENZI, 1992). Essa espécie também é conhecida como tapiá, tanheiro-de-folha-longa, maria-mole, tamanqueiro (LISTA ..., 2004) (Figura 6).



**Figura 5:** *Alchornea triplinervia*. (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira (Lorenzi, 1992).



**Figura 6:** *Alchornea glandulosa*. (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira (Lorenzi, 1992).

Além das cidades onde foram feitas as coletas, Piracicaba e Botucatu, existem no estado de São Paulo registros da ocorrência da *A. triplinervia* em Assis e da *A. glandulosa* em Tarumã (ESPÉCIES ARBÓREAS ..., 2003).

Estudos etnofarmacológicos já foram realizados com as plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa*. Algumas informações foram coletadas junto a populações locais no Brasil (Tocantins), confirmando o uso tradicional dessas espécies principalmente no tratamento de moléstias estomacais (HIRUMA-LIMA, 2002)\*.

Alcalóides, flavonóides e outros compostos fenólicos foram isolados de espécies do gênero *Alchornea* (BRACA et al., 2002).

Outras espécies do gênero, como a *A. castaneifolia*, a *A. cordifolia*, *A. laxiflora* e a *A. latifolia* possuem efeitos biológicos relatados (AYISI e NYADEDZOR, 2003; DUNSTAN et al., 1997; OGUNGBAMILA e SAMUELSSON, 1990; OLATUNDE FAROMBI et al., 2003).

Conegero et al. (2003) fizeram uma análise de algumas das propriedades biológicas relatadas, utilizando extratos brutos e compostos isolados de espécies do gênero *Alchornea*. Entre as atividades encontradas estão: antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica, antidiarréica, citotóxica contra células cancerosas Hep-G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e A-431 (carcinoma epidermóide).

A *Alchornea castaneifolia* também é conhecida como iporuru. As folhas e a casca dessa árvore são utilizadas pelos índios da Amazônia no tratamento de reumatismo, artrite, osteoartrite, resfriado, diabetes, dor muscular, aumento da fertilidade feminina e também como afrodisíaco (TAYLOR, 1998). Essa planta demonstrou moderada atividade inibitória da biossíntese de prostaglandina catalisada pela ciclooxigenase-1 (COX-1) e também forte inibição do edema

---

\* HIRUMA-LIMA, C. A. Uso popular do gênero *Alchornea*. 2002. (Comunicação pessoal)

induzido por etilfenilpropiolato em orelha de rato (DUNSTAN et al., 1997). Uma análise fitoquímica inicial revelou a presença de esteróides, saponinas, fenóis, flavonóides, flavonas, taninos, xantonas e alcalóides (TAYLOR, 1998). As propriedades antiinflamatórias da iporuru são atribuídas a um grupo de alcalóides, incluindo um chamado alcorneína, que é encontrado na casca dessa árvore e também em outras espécies de *Alchornea* (OGUNGBAMILA e SAMUELSSON, 1990).

A *Alchornea cordifolia* é uma planta utilizada em muitos países da África no tratamento de doenças bacterianas, fúngicas, parasitárias e inflamatórias (MANGA et al., 2004). Estudo feito em 2003 demonstrou que o extrato aquoso da *Alchornea cordifolia* é um efetivo inibidor da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e do vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (HIV-2). Na tentativa de delinear o potencial terapêutico desse extrato nas infecções causadas pelo HIV, testes serão realizado com outras cepas, incluindo aquelas resistentes a azatioprina (AZT) (AYISI e NYADEDZOR, 2003). Além disso, o extrato metanólico dessa planta também mostrou intensa atividade antiinflamatória de maneira dose-dependente após a aplicação tópica. Os autores explicam essa atividade, pelo menos parcialmente, devido à presença de compostos lipofílicos não identificados e flavonóides como hiperosídeo e quercetrina. Contudo, os autores sugerem que outros compostos provavelmente possam contribuir para essa atividade (MANGA et al., 2004). Esses resultados são similares aos obtidos por Osadebe e Okoye que, em 2003, já haviam demonstrado em estudos com modelo de edema de pata, as atividades antiinflamatórias dessa planta com a utilização de extrato e frações.

Pesquisas feitas com a *Alchornea laxiflora*, planta utilizada na Nigéria para a preservação de alimentos, sugerem que essa planta contém potentes antioxidantes naturais que teriam um importante papel na preservação de produtos com alto teor lipídico propensos à oxidação e rancidificação (OLATUNDE FAROMBI et al., 2003).

Substâncias isoladas da *Alchornea latifolia* mostraram atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens tumorais Hep-G2 (carcinoma hepatocelular) e A-431 (carcinoma epidermóide) e também potentes inibidores da topoisomerase II (SETZER et al., 2000).

---

## ***II - OBJETIVOS***

O objetivo deste trabalho foi estudar as ações dos extratos e frações de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa* sobre o sistema imunológico. Para tanto, foram realizados ensaios para a determinação de um possível efeito imunomodulador sobre células murinas. Desse modo, investigou-se a ação dessas plantas com relação à:

- ativação de macrófagos murinos através da determinação de  $H_2O_2$ , NO e TNF- $\alpha$ .
- inibição da liberação de  $H_2O_2$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por PMA.
- inibição da liberação de NO e TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.
- comparação dessas duas espécies do gênero *Alchornea* com base nos testes acima citados.

---

### ***III – MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3.1. Etapa botânica

As plantas medicinais *A. triplinervia* e *A. glandulosa* fazem parte do Projeto Temático Biota - FAPESP (Uso sustentável da biodiversidade brasileira. Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores. Processo nº 02/05503-6).

A etapa botânica envolveu a escolha de espécies viáveis para o estudo imunológico, isto é, aquelas que apresentaram crescimento e quantidade de material suficiente para a continuidade dos estudos. Além disso, as espécies investigadas neste projeto são encontradas no Estado de São Paulo e possuem informações etnofarmacológicas.

As folhas de *A. triplinervia* foram coletadas no Jardim Botânico do Instituto de Biociências - UNESP, município de Botucatu, São Paulo, pelos doutorandos Tamara Regina Calvo (Instituto de Química - UNESP – Araraquara/SP) e Luís Fernando Rolim (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu/SP). A planta está sendo identificada pelo Prof. Jorge Tamashiro (Instituto de Biologia - UNICAMP/SP). As folhas da *A. glandulosa* também foram coletadas por eles na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), município de Piracicaba, São Paulo. A identificação foi realizada pelo Prof. Jorge Tamashiro. Uma exsicata de número 132828 foi depositada no Herbário da Universidade de Campinas - UNICAMP-SP.

### 3.2. Etapa química

Esta etapa foi realizada no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela pós-graduanda Tamara Regina Calvo sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

### 3.2.1. Obtenção do extrato metanólico das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa*

As folhas de ambas espécies foram secas em estufa a 40<sup>0</sup>C e trituradas em moinho de facas. Em seguida, 500g foram submetidas a extrações por maceração em metanol (MeOH) (2L, 3 vezes-48h, cada). Após a evaporação do solvente em rotaevaporador foram obtidos os extratos metanólicos (*Alchornea triplinervia*: 74,7g; *Alchornea glandulosa*: 59,1g). O extrato metanólico possui todos os constituintes polares da planta.

### 3.2.2. Obtenção da fração acetato de etila das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa*

O extrato metanólico da planta *A. triplinervia* (28,3g) foi particionado em uma mistura de acetato de etila/água (AcOEt/H<sub>2</sub>O, 1:1, v/v) resultando em 7,8g de porção acetato de etila.

Semelhantemente, o extrato metanólico da planta *A. glandulosa* (15,0g) foi particionado em uma mistura de acetato de etila/água (AcOEt/H<sub>2</sub>O, 1:1, v/v) resultando em 3,0g de porção acetato de etila.

A partição foi realizada para separar os compostos polares em duas classes e facilitar o isolamento. Na fração aquosa ficam as substâncias mais polares do extrato metanólico e na fração acetato de etila, que foi estudada nesse trabalho, estão os compostos menos polares do extrato metanólico.

No caso específico da *A. triplinervia* e *A. glandulosa*, também foi realizada a partição devido à presença de tanino nessas plantas. Após a partição, os taninos ficam retidos na fração aquosa. Portanto, a fração acetato de etila está isenta desses compostos.

### 3.2.3. Estudos fitoquímicos

Inicialmente, foi realizada uma triagem química dos extratos metanólico da *A. triplinervia* e da *A. glandulosa* através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) (Silicagel,

acetato de etila/n-propanol/água 140:8:80, v/v/v), juntamente com padrões. As placas foram reveladas com vapores de iodo e solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (compostos fenólicos), *Natural product/polyethylenoglicol* (NP/PEG) (flavonóides), Iodoplatinato e Dragendorff (alcalóides), anisalaldeído/ácido sulfúrico (saponinas, terpenos e esteróides). A presença de saponinas foi confirmada pela formação de espuma persistente quando da agitação de uma alíquota do extrato em um tubo de ensaio com água (SIMÕES et al., 2001). Foi preparada uma infusão com 1g do extrato metanólico em 20mL de água destilada e, após filtração, foram adicionadas gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  1% (em metanol). A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis (MATOS, 1997).

Na parte fitoquímica foram utilizadas as técnicas cromatográficas usuais, principalmente aquelas para substâncias polares: cromatografia de permeação em gel (GPC), poliestireno-divinilbenzeno (XAD2), cromatografia de contra-corrente de gotejamento (DCCC), cromatografia de contra-corrente de alta velocidade (HSCCC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A determinação estrutural foi realizada por métodos espectroscópicos: espectrometria de massas (EM), ultravioleta (UV), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN).

#### **3.2.4. Extratos e frações para ensaios biológicos**

Os extratos e frações acetato de etila foram obtidos de acordo com a metodologia anteriormente descrita (item 3.2.1. e 3.2.2.), sendo o processo repetido tantas vezes quantas foram necessárias até a obtenção de quantidades suficientes para a execução dos ensaios biológicos.

Os extratos metanólicos e as frações acetato de etila foram primeiramente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos testes. Foram preparadas soluções-mãe na concentração de 100mg/mL para todos os extratos e frações testados. A partir da solução-mãe

foram feitas diluições seriadas em meio de cultura (RPMI-1640) e assim, foram obtidas as concentrações de 7,81µg/mL, 15,62µg/mL, 31,25µg/mL, 62,50µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL e 500µg/mL. No máximo, 0,5% de DMSO foi utilizado.

Nos ensaios de determinação da produção ou inibição da citocina TNF- $\alpha$  foram utilizadas somente as concentrações de 15,62µg/mL, 62,50µg/mL e 250µg/mL. Visando a otimização dos ensaios, foram escolhidas concentrações baseadas na citotoxicidade.

### **3.3. Etapa imunológica**

#### **3.3.1. Animais**

Em cada experimento foram utilizados 05 camundongos Swiss machos de 6 semanas, pesando entre 18 e 25 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, situado na cidade de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado ( $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $56 \pm 2\%$  de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

#### **3.3.2. Obtenção dos macrófagos peritoneais**

Os animais foram previamente inoculados intraperitonealmente, com 3,0mL de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%, três a quatro dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados em câmara contendo clorofórmio. O peritônio foi exposto em fluxo laminar horizontal classe 100 (Veco) para a retirada do exsudato peritoneal. Na porção mediana superior do abdômen foi injetado 5,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril em pH 7,2 e a  $4^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de seringa e agulha também estéreis.

Uma leve massagem manual foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril (Corning, Inc.) para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5mL de PBS (pH 7,2) e centrifugadas a  $400 \times g$  por 5 minutos em centrífuga (Fanem) à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 5% de soro fetal bovino, 2-mercaptoetanol ( $2 \times 10^{-5}M$ ), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100U/mL) e L-glutamina (2mM) e assim designado como meio completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) com a utilização de 10 $\mu$ L da suspensão celular diluída em 90 $\mu$ L do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio RPMI-1640-C. Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific) para a aderência de macrófagos. As células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

### **3.3.3. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais**

Sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da citocina TNF- $\alpha$ . As células peritoneais foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1,0mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640. Na avaliação da produção TNF- $\alpha$  (item 3.3.5.3.) foi adicionado 1mL de RPMI-1640-C e 1mL dos extratos das

plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* aos macrófagos que ficaram aderidos a placa. Além disso, foram adicionados aos macrófagos de alguns orifícios da placa, LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo O111:B4 - Difco) a 1 µg/mL (1mL) e meio de cultura RPMI-1640-C (1mL), utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Na avaliação da inibição da produção de TNF-α (item 3.3.6.3.) foram adicionados conjuntamente 1mL de RPMI-1640-C, 1mL dos extratos ou frações das plantas e 1mL de LPS a 1 µg/mL aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Da mesma forma, LPS a 1 µg/mL (1mL) foi utilizado como controle positivo e somente RPMI-1640-C (1mL) como controle de negativo. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub> por mais 24 h. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para *ependorffs* que foram, em seguida, centrifugados a 7800 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliqüotados em *ependorffs* e estocados em freezer a -80° C até o momento da determinação da citocina através do teste imunoenzimático ELISA de captura.

#### **3.3.4. Avaliação da citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em fases distintas. Em uma primeira fase, os macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados separadamente com DMSO (item 3.3.4.1.) e com as preparações obtidas a partir dos extratos metanólicos das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* (item 3.3.4.2.). Em uma segunda fase, macrófagos foram estimulados por PMA a 0,2µM e incubados com essas mesmas preparações obtidas a partir dos extratos e frações (item 3.3.4.3.). Por fim, na terceira fase, macrófagos foram estimulados por LPS a 1µg/mL e também incubados com as preparações obtidas dos extratos e frações (item 3.3.4.4.).

Os experimentos foram realizados utilizando a técnica de MTT (MOSMANN, 1983). Em uma placa de microtitulação de 96 cavidades, foram incubadas suspensões de células do exsudato peritoneal (100µL por cavidade), na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL ou  $2 \times 10^6$  células/mL, por 60 minutos para a aderência das células (item 3.3.2.). Os macrófagos aderentes, estimulados ou não com PMA ou LPS, foram incubados novamente junto com as preparações obtidas a partir dos extratos metanólicos e/ou frações acetato de etila das plantas. O tempo de incubação foi de 1 hora ou 24 horas, variando de acordo com o experimento. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100µL de solução de MTT (Sigma) a 1mg/mL foi adicionado a cada orifício. A placa foi então incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100µL de álcool isopropílico (Mallinckrodt) foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura RPMI-1640 foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade dos macrófagos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

#### **3.3.4.1. Viabilidade celular na presença de dimetilsulfóxido (DMSO)**

Foram feitos experimentos para avaliar a citotoxicidade do DMSO uma vez que todas os extratos e frações foram primeiramente diluídos nesse reagente. Nessa etapa, foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente, os macrófagos aderentes foram incubados com diferentes concentrações de DMSO (100µL) por 24h. A partir dos resultados encontrados foi definida a quantidade máxima

permitida de DMSO que poderia estar contida em cada amostra para que não houvesse interferência nos experimentos.

#### **3.3.4.2. Viabilidade celular na presença dos extratos metanólicos das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa***

Suspensões de células do exsudato peritoneal foram ajustadas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência das células, os macrófagos foram incubados com 100  $\mu$ L das preparações obtidas dos extratos das plantas por 24h. O objetivo desse experimento foi avaliar a viabilidade dos macrófagos na presença de diferentes concentrações dos extratos.

#### **3.3.4.3. Viabilidade dos macrófagos estimulados por PMA na presença dos extratos e frações das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa***

Suspensões de células do exsudato peritoneal foram ajustadas na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Então, os macrófagos aderentes foram incubados concomitantemente com 50  $\mu$ L de PMA (0,2  $\mu$ M) e com 50  $\mu$ L das preparações obtidas a partir dos extratos metanólicos e frações das plantas por 1h. O objetivo desse experimento foi avaliar a viabilidade dos macrófagos na presença simultânea de PMA e das preparações dos extratos e frações em diferentes concentrações. A viabilidade dos macrófagos somente na presença de PMA (0,2  $\mu$ M) também foi avaliada.

#### **3.3.4.4. Viabilidade dos macrófagos estimulados por LPS na presença dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa***

Nessa última fase, suspensões de células do exsudato peritoneal foram ajustadas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente, os macrófagos aderentes foram incubados concomitantemente com 100  $\mu$ L de LPS (1  $\mu$ g/mL) e com 100  $\mu$ L das preparações obtidas a partir dos extratos metanólicos e frações das plantas por 24h. O objetivo desse experimento foi avaliar a viabilidade dos macrófagos na presença simultânea de LPS e das preparações dos extratos e frações em diferentes concentrações. A viabilidade dos macrófagos na presença somente de LPS a 1  $\mu$ g/mL também foi avaliada.

### **3.3.5. Avaliação da estimulação de macrófagos**

#### **3.3.5.1. Determinação da liberação de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por macrófagos peritoneais de camundongos**

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari (1980) e adaptado por Pick e Mizel (1981). Foram preparadas suspensões de células peritoneais ajustadas na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência, as células foram incubadas em solução de vermelho de fenol, contendo: 140mM de NaCl, 10mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 5,5mM de dextrose, 0,56mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte tipo II (0,01mg/mL, Sigma), juntamente com 50  $\mu$ L das preparações obtidas a partir dos extratos metanólicos, por 1h a 37° C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. Somente células em solução completa de vermelho de fenol foram utilizadas como controle negativo. Além disso, foram adicionados em algumas cavidades da placa 50  $\mu$ L de uma solução de PMA a 0,2  $\mu$ M (Sigma). Essas cavidades foram utilizadas como controle positivo. Decorrido o prazo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de NaOH 5N, e a seguir foram feitas

leituras em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystem Research Tech. Div., Helsinki, Finland) a 620nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nanomols de  $H_2O_2/2 \times 10^5$  células peritoneais, a partir de curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de  $H_2O_2$  em tampão vermelho de fenol.

### **3.3.5.2. Determinação de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos**

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido espectrofotometricamente usando reagente de Griess com nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) como padrão (GREEN et al., 1982).

Em cada orifício de uma placa de 96 cavidades foram adicionados 100 $\mu$ L de uma suspensão celular ajustada na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência das células, a placa foi incubada com 100 $\mu$ L das preparações obtidas a partir dos extratos metanólicos ou somente meio de cultura RPMI-1640 (controle negativo), por 24 h a 37°C em estufa com tensão constante de 7,5% de  $CO_2$ . Como controle positivo, foi utilizado 100 $\mu$ L de uma solução de LPS a 1  $\mu$ g/mL. Após a incubação, alíquotas de 100 $\mu$ L do sobrenadante da cultura foram misturadas com 100 $\mu$ L do reagente de Griess (sulfanilamida 0,1%; N-naftil-etilenodiamino 0,1% e ácido fosfórico a 3%). Após 10 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 540 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Labsystem, Finlândia). Os dados foram expressos como  $\mu$ mols/ $5 \times 10^5$  células peritoneais/orifício através de curva-padrão obtida anteriormente com concentrações molares conhecidas de  $NaNO_2$  (Merck) em meio RPMI-1640.

### **3.3.5.3. Determinação da liberação da citocina TNF- $\alpha$ por macrófagos peritoneais de camundongos**

A citocina TNF- $\alpha$  foi quantificada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, obtidos como descrito no item 3.3.3. através do teste imunoenzimático ELISA de captura. O kit Mouse TNF ELISA Set (Mono/Poli) da BD Biosciences Pharmingen foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-TNF- $\alpha$ . As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,0. contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e posteriormente bloqueadas com 300 $\mu$ L/cavidade com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,0. contendo 10% de soro fetal bovino (PBS-S) à temperatura ambiente por 60 minutos. Então, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 $\mu$ L do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 $\mu$ L/cavidade do anticorpo de detecção (anticorpo anticitocina de camundongo marcado com biotina) diluído em PBS-S. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 $\mu$ L/cavidade do conjugado avidina-peroxidase diluído 1/250 em PBS-S. As placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T e em seguida foi adicionado a cada cavidade 100 $\mu$ L do substrato [10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Malinckrodt)]. A reação foi interrompida adicionando-se 50 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm

em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) e as concentrações da citocina foram quantificadas utilizando-se curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões. Os resultados foram expressos em pg/mL.

### **3.3.6. Determinação da atividade inibitória dos extratos e frações de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$ .**

#### **3.3.6.1. Quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Células do exsudato peritoneal na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL foram utilizadas. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de 50 $\mu$ L de PMA (0,2 $\mu$ M) e 50 $\mu$ L das preparações obtidas a partir dos extratos e frações das plantas durante 1 hora em estufa à 37°C com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida espectrofotometricamente através do método de Pick e Keisari (1980) de acordo com o item 3.3.5.1.

#### **3.3.6.2. Quanto à produção de NO**

Células do exsudato peritoneal, na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL, foram utilizadas. Após a aderência, os macrófagos foram incubados em presença de 100 $\mu$ L de solução de LPS (1 $\mu$ g/mL) e 100 $\mu$ L das preparações obtidas a partir dos extratos e frações das plantas. A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo com o item 3.3.5.2.

### 3.3.6.3. Quanto à produção TNF- $\alpha$

Conforme anteriormente descrito, a citocina TNF- $\alpha$  foi quantificada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais (item 3.3.3) através do teste imunoenzimático ELISA de captura (item 3.3.5.3.).

### 3.3.6.4. Cálculo da porcentagem de inibição

Foram calculadas as porcentagens de inibição, através de comparação com os controles, nos experimentos onde as preparações obtidas a partir dos extratos e frações apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$ . A equação abaixo foi utilizada para o cálculo.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\mathbf{A - B}}{\mathbf{A - C}} \times 100$$

Onde A, B e C correspondem a:

**A**= PMA (+), extrato ou fração (-)

**B**= PMA (+), extrato ou fração (+)

**C**= PMA (-), extrato ou fração (-)

Nos testes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**A**= LPS (+), extrato ou fração (-)

**B**= LPS (+), extrato ou fração (+)

**C**= LPS (-), extrato ou fração (-)

Nos testes de NO e TNF- $\alpha$ .

### **3.3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet de acordo com o programa Graphpad Instat versão 3.05. O nível de significância foi de 5%, ou seja, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

---

## ***IV – RESULTADOS***

#### 4.1. Estudos fitoquímicos

Esta etapa foi realizada pela pós-graduanda Tamara Regina Calvo sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas. Um resumo do estudo fitoquímico realizado até o momento está descrito a seguir.

A triagem química realizada através de CCDC indicou que os extratos metanólicos das plantas *A. glandulosa* e *A. triplinervia* possuem perfis químicos semelhantes. Os principais constituintes encontrados nos extratos metanólicos das plantas estão descritos na Tabela 4. Além da CCDC, foi realizada a análise dos extratos metanólicos das duas plantas por HPLC e os resultados novamente demonstraram a presença de perfis químicos semelhantes. Por esse motivo, inicialmente, foi dada ênfase ao estudo do extrato metanólico da *Alchornea glandulosa*.

Desse modo, foi realizada a partição do extrato metanólico da *A. glandulosa* em acetato de etila/água (AcOEt/H<sub>2</sub>O - 1:1, v/v), seguida de fracionamento da porção AcOEt em Sephadex LH-20. Após análise por CCDC, as frações com poucas manchas e quantidade de massa suficiente foram purificadas por cromatografia em coluna (CC) (polivinil-polipirrolidona (PVPP), sílica gel, HPLC) resultando no isolamento e/ou identificação de ácido gálico (**Ag5**), galato de metila (**Ag6**), um alcalóide (**Ag7**), quercetina (**Ag8**), quercetina 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo (**Ag9**) e amentoflavona (**Ag10**).

Na análise do perfil químico da *A. glandulosa* por HPLC, a metodologia que mostrou ser a mais adequada foi o gradiente linear de acetonitrila/água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) em 60min, monitorado a 210nm. A identificação dos picos cromatográficos majoritários foi realizada por co-injeção e comparação dos tempos de retenção de substâncias isoladas da planta e padrões comerciais. Além disso, foi feita a comparação dos espectros de UV obtidos com os espectros típicos de classes de metabólitos descritos na literatura. Sendo possível a

identificação das substâncias e/ou classes de compostos dos picos majoritários. Picos 1 e 2: derivados do ácido gálico (**Ag5 -6**); pico 4: derivado do kaempferol; picos 5, 6, 8, 9, 11 e 17: derivados da quercetina, sendo 5, 6, 9 e 17: miricetina 3-*O*- $\alpha$ -L-raminopiranosídeo (**Ag12**), quercetina 3-*O*- $\alpha$ -L-galactopiranosídeo (**Ag11**), quercetina 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo (**Ag9**) e quercetina (**Ag8**), respectivamente. Picos 18 e 3: amentoflavona (**Ag10**) e um derivado, respectivamente; pico 14: alcalóide tetraidroimidazo [1,2- $\alpha$ ] imidazólico (a confirmar); pico 15: alcalóide tetraidroimidazo [1,2- $\alpha$ ] pirimidínico; e picos 16 e 19: alcalóides guanidínicos.

Portanto, a maioria dos compostos encontrados na *A. glandulosa* são compostos fenólicos, como derivados do ácido gálico e majoritariamente flavonóides com uma unidade de açúcar, além da presença de alcalóides guanidínicos.

Até o momento, o extrato metanólico da *A. triplinervia* foi particionado e fracionado (Sephadex LH-20) de modo análogo ao descrito para extrato metanólico da *A. glandulosa*. A comparação das frações obtidas por Sephadex LH-20 das duas plantas demonstrou que ambas apresentam substâncias semelhantes, corroborando os perfis obtidos por HPLC.

Diante destes resultados, está sendo dada continuidade ao estudo de espécies de *Alchornea*, com isolamento e identificação dos constituintes químicos. Bem como otimização dos métodos de obtenção de substâncias, visando quantidades suficientes para realização dos ensaios farmacológicos.

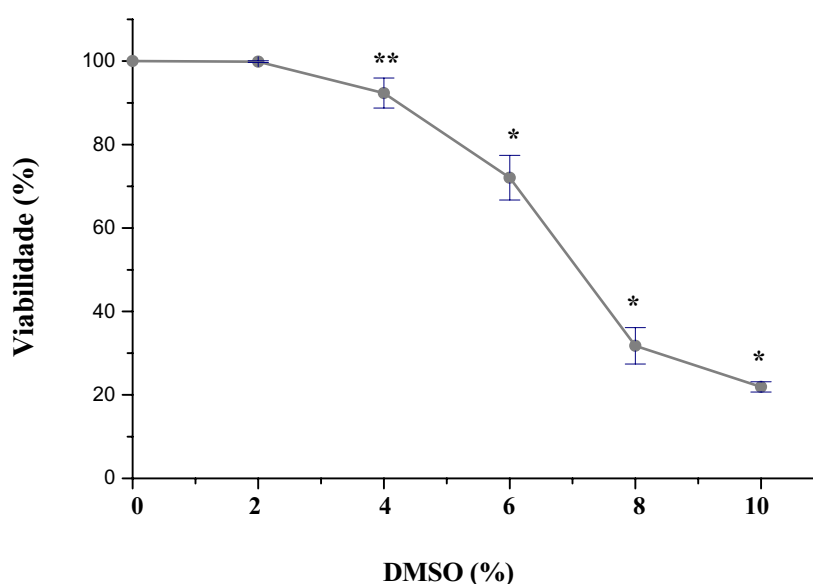
**Tabela 4:** Principais constituintes da *A. triplinervia* e *A. glandulosa* observados em CCDC.

<i>Alchornea triplinervia</i>	<i>Alchornea glandulosa</i>
alcalóides	alcalóides
flavonóides	flavonóides
saponinas	terpenóides
taninos	saponinas

## **4.2. Avaliação da citotoxicidade**

### **4.2.1. Viabilidade celular na presença de dimetilsulfóxido (DMSO)**

A capacidade dos macrófagos reduzirem o MTT pode ser interpretada como uma medida da viabilidade celular. Pode ser observado (Figura 7) que o DMSO é citotóxico para os macrófagos. Houve grande variação na viabilidade das células conforme o aumento da porcentagem de DMSO. A viabilidade dos macrófagos em contato com uma solução de 2% de DMSO foi de 99,89%, enquanto que apenas 21,92% dos macrófagos permaneceram viáveis na presença de uma amostra com 10% de DMSO. Desse modo, todas as preparações obtidas a partir dos extratos das plantas testadas nesse trabalho possuíram no máximo 0,5% de DMSO.



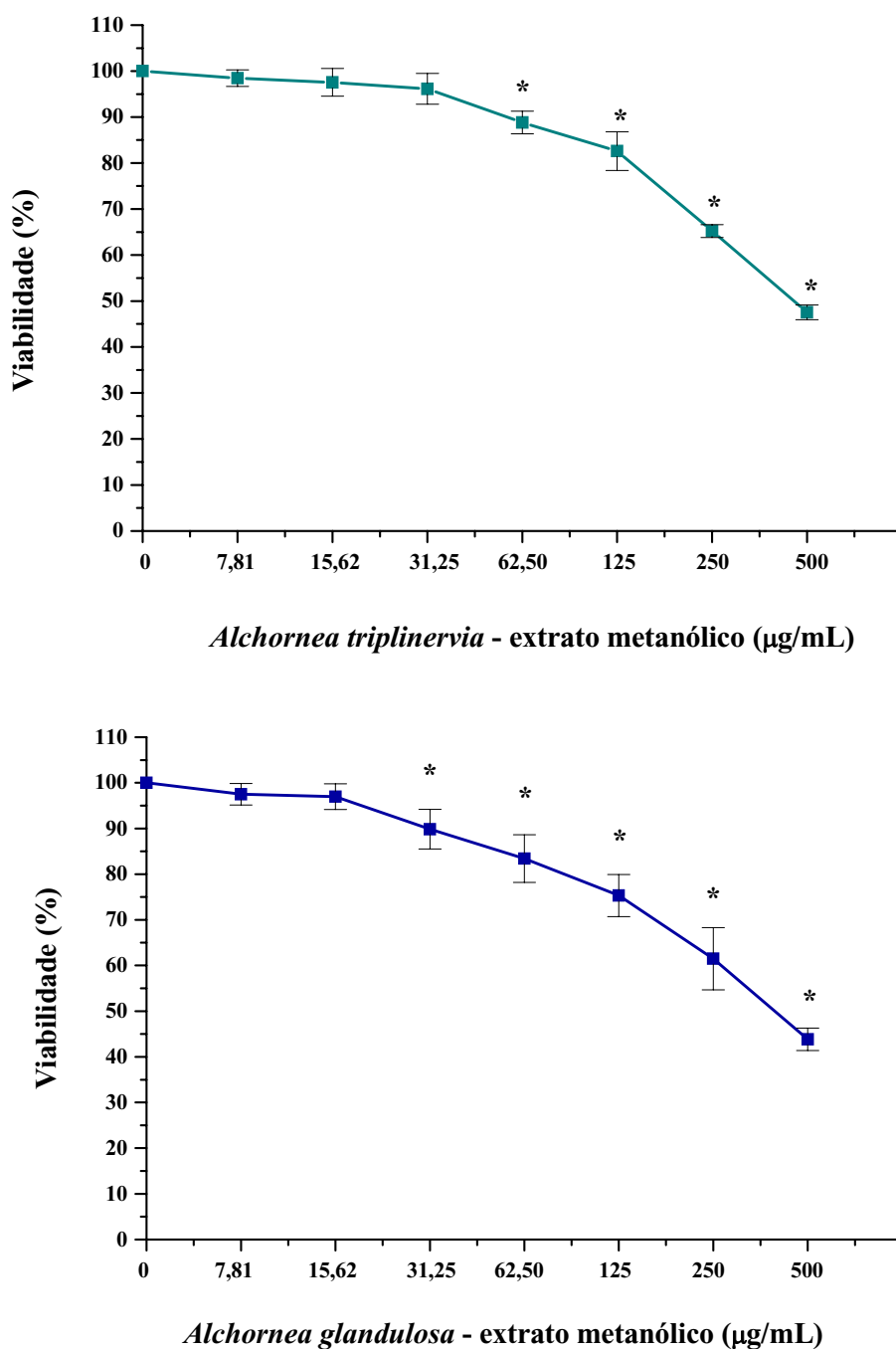
**Figura 7: Viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss na presença de dimetilsulfóxido (DMSO).** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos aderentes previamente incubados com diferentes concentrações de DMSO durante 24h de incubação. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de determinações de cinco animais realizadas em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$  quando comparados ao controle.

#### 4.2.2. Viabilidade celular na presença dos extratos metanólicos das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa*

O objetivo deste teste de viabilidade foi observar o potencial citotóxico dos extratos. Na Figura 8 é possível observar que o extrato metanólico da *A. triplinervia* e o extrato metanólico da *A. glandulosa* são tóxicos para os macrófagos quando utilizados em altas concentrações. Nas concentrações de  $7,81 \mu\text{g/mL}$  até  $62,50 \mu\text{g/mL}$  de ambos os extratos, a viabilidade dos macrófagos foi superior a 83%. Nas amostras menos concentradas ( $7,81 \mu\text{g/mL}$  e  $15,62 \mu\text{g/mL}$ ) a viabilidade foi superior a 95%.

Os resultados dos testes de viabilidade do extrato metanólico da *A. triplinervia* e da *A. glandulosa* foram semelhantes (Tabela 5).



**Figura 8: Viabilidade de macrófagos peritoneais na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos aderentes previamente incubados com as preparações obtidas dos extratos durante 24h de incubação. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$  quando comparados ao controle.

**Tabela 5:** Viabilidade dos macrófagos peritoneais na presença das preparações obtidas dos extratos metanólicos da *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa* em diferentes concentrações.

VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS (%)							
EXTRATOS (µg/mL)	7,81	15,62	31,25	62,50	125	250	500
<i>Alchornea triplinervia</i>	98,45 ± 1,80	97,55 ± 3,03	96,14 ± 3,33	88,82 ± 2,46*	82,59 ± 4,21*	65,22 ± 1,40*	47,54 ± 1,60*
<i>Alchornea glandulosa</i>	97,51 ± 2,37	96,97 ± 2,82	89,83 ± 4,34*	83,41 ± 5,22*	75,32 ± 4,60*	61,49 ± 6,83*	43,83 ± 2,46*

Avaliação realizada após 24 horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

\* p<0,01 quando comparado ao controle (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

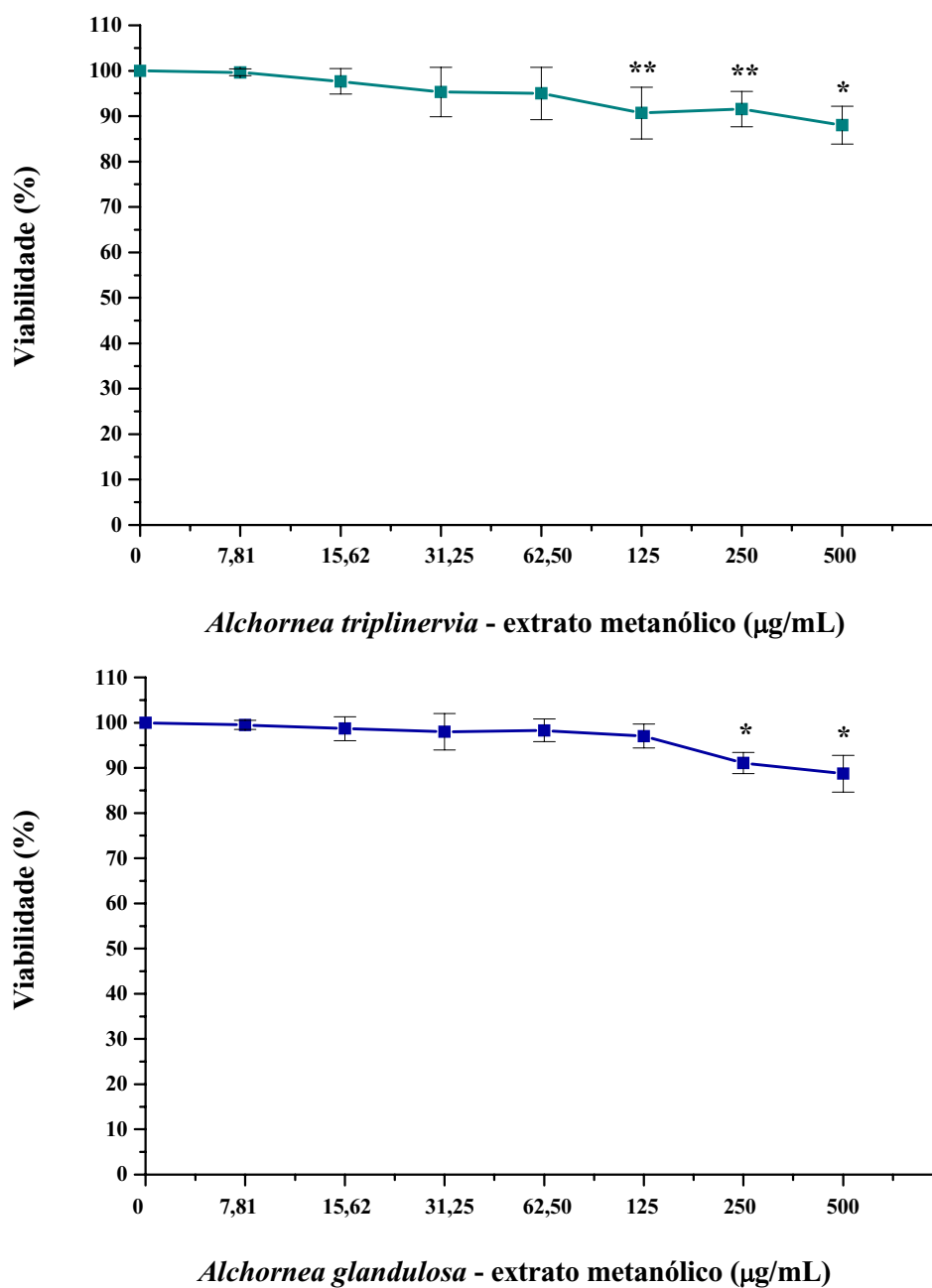
#### **4.2.3. Viabilidade dos macrófagos estimulados por PMA na presença dos extratos e frações das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa*.**

Nas Figuras 9 e 10, podem ser observadas as viabilidades dos macrófagos quando incubados, respectivamente, com PMA e extratos metanólicos e com PMA e frações acetato de etila de ambas as plantas. A viabilidade da cultura de macrófagos, somente na presença de PMA, foi de  $99,92 \pm 0,15\%$  (Tabela 6).

Nos experimentos de inibição de  $H_2O_2$ , os macrófagos ficam em contato com o PMA, extratos ou frações somente por 1 hora de incubação. Através desses experimentos, foi analisada a influência da adição conjunta de PMA e extratos, ou PMA e frações, na viabilidade dos macrófagos mesmo durante reduzido tempo de incubação (1h).

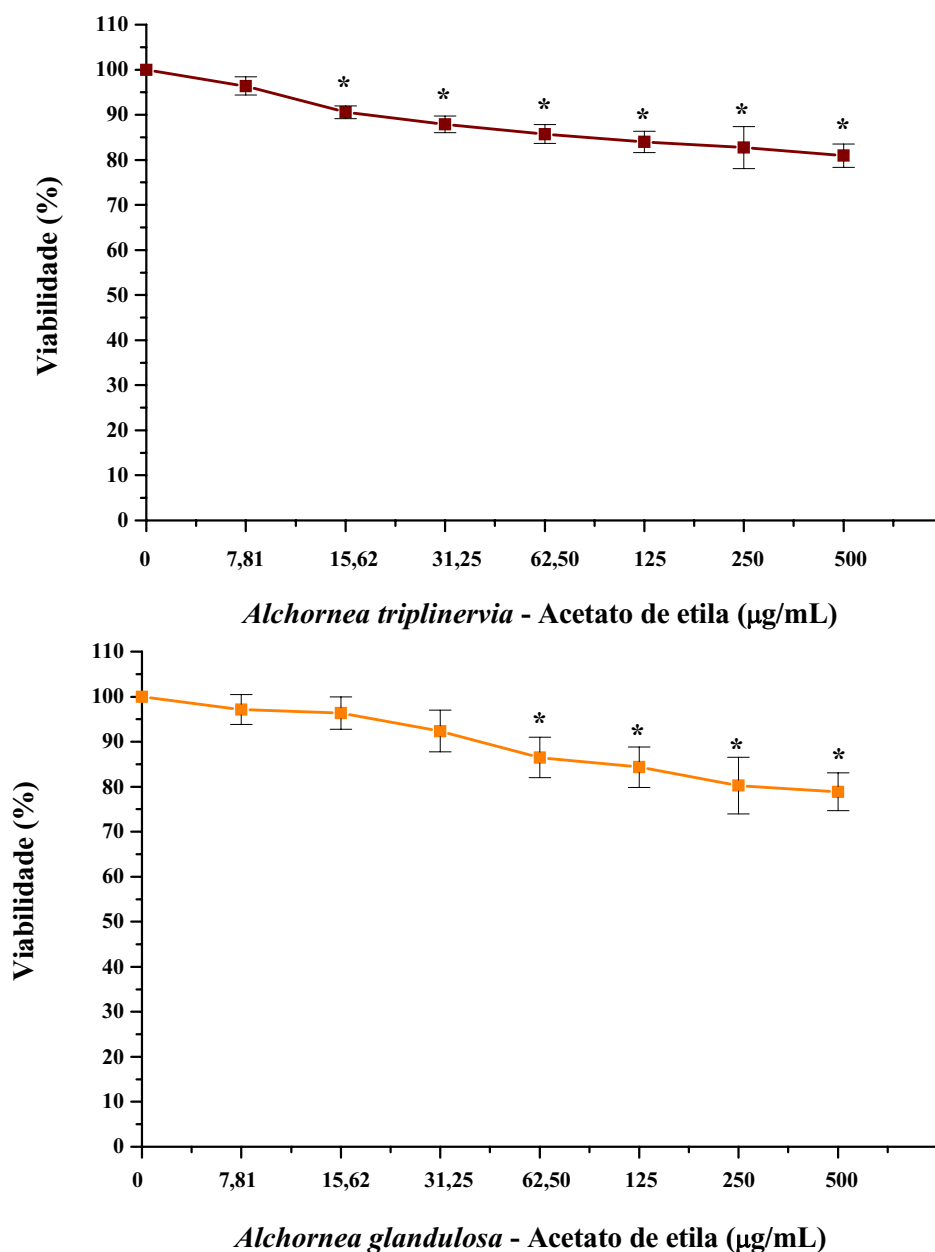
Pôde ser observado que a viabilidade dos macrófagos foi alta, sempre maior que 88%, quando eles foram estimulados simultaneamente com PMA e os extratos de ambas as plantas. Os valores de viabilidade também foram altos na presença de PMA e das frações, sempre maior do que 78%. Contudo, as frações se mostraram mais citotóxicas que os extratos.

As plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* novamente apresentaram resultados muito semelhantes (Tabela 6).



**Figura 9: Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por PMA na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos aderentes previamente incubados na presença de PMA a  $0,2 \mu\text{M}$  e das preparações obtidas do extrato metanólicos durante 1 hora de incubação. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 10: Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por PMA na presença de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos aderentes previamente incubados na presença de PMA a  $0,2 \mu\text{M}$  e das preparações obtidas das frações durante 1 hora de incubação. Apenas células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle.

**Tabela 6:** Viabilidade dos macrófagos peritoneais estimulados com PMA (0,2µM) na presença das preparações obtidas dos extratos e frações da *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa* em diferentes concentrações.

**VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR PMA (%)**

EXTRATOS E FRAÇÕES (µg/mL)	7,81	15,62	31,25	62,50	125	250	500
<i>A. triplinervia</i> (ext. metanólico)	99,63 ± 0,74	97,67 ± 2,76	95,31 ± 5,42	95,00 ± 5,77	90,68 ± 5,71**	91,59 ± 3,88**	88,03 ± 4,18*
<i>A. glandulosa</i> (ext. metanólico)	99,50 ± 1,01	98,67 ± 2,66	97,99 ± 4,01	98,29 ± 2,52	97,03 ± 2,63	91,09 ± 2,32*	88,70 ± 4,04*
<i>A. triplinervia</i> (fr. acetato de etila)	96,38 ± 2,03	90,59 ± 1,40*	87,91 ± 1,82*	85,71 ± 2,09*	83,97 ± 2,37*	82,72 ± 4,65*	80,92 ± 2,61*
<i>A. glandulosa</i> (fr. acetato de etila)	97,12 ± 3,33	96,36 ± 3,59	92,34 ± 4,63	86,51 ± 4,51*	84,34 ± 4,48*	80,26 ± 6,28*	78,87 ± 4,20*

Avaliação realizada após 1 hora de incubação. A viabilidade dos macrófagos peritoneais, somente na presença de PMA (0,2µM), foi de 99,92 ± 0,15%. Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

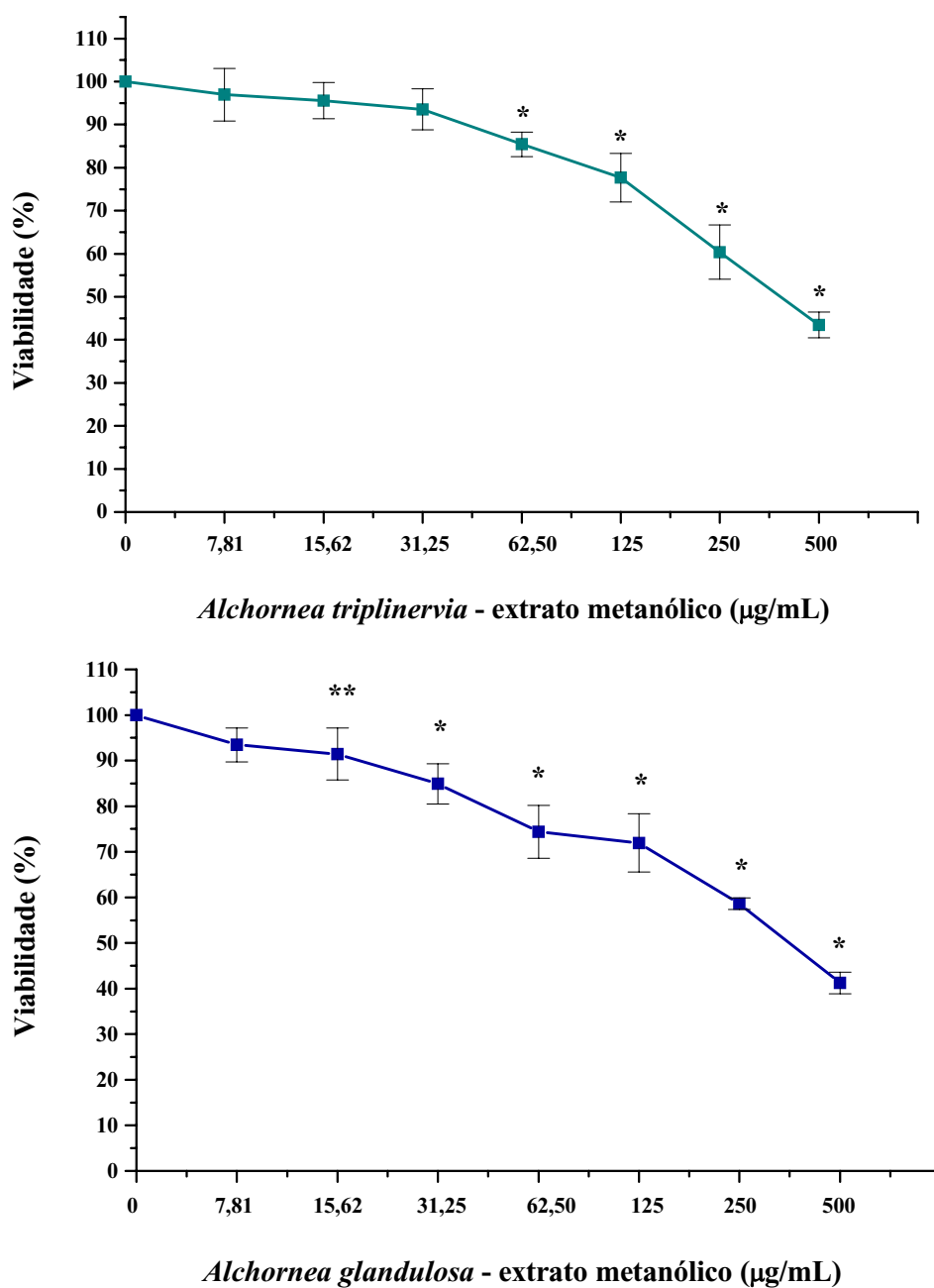
\* p<0,01, \*\* p<0,05 quando comparados ao controle (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

#### **4.2.4. Viabilidade dos macrófagos estimulados por LPS na presença dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa***

Estes experimentos, de modo análogo àqueles utilizando PMA no item 4.2.3., foram realizados com o objetivo de observar se a presença simultânea de LPS e extratos, e LPS e frações, alteraria a viabilidade dos macrófagos. A viabilidade da cultura de macrófagos somente na presença de LPS foi de  $97,61 \pm 3,21\%$  (Tabela 7).

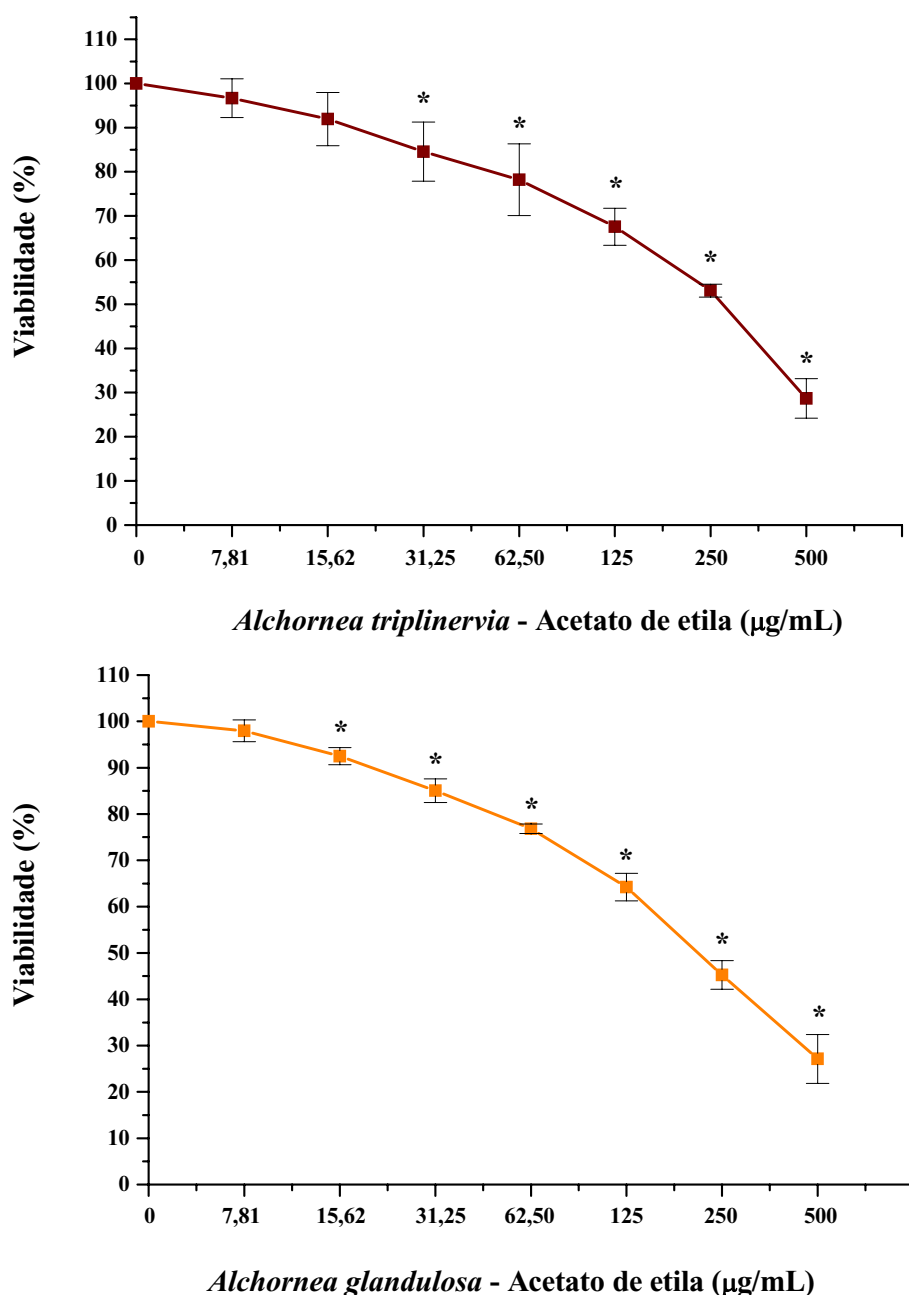
Analisando-se os extratos metanólicos, foram observados resultados semelhantes aos dos experimentos de viabilidade previamente realizados na ausência de LPS (item 4.2.2.). A viabilidade das células, somente na presença das preparações obtidas a partir dos extratos (4.2.2.), variou aproximadamente de 43% a 98% (Figura 8; Tabela 5). Contudo, na presença simultânea de LPS (1 $\mu$ g/mL) e das mesmas preparações, a variação foi de 41% a 96% (Figura 11; Tabela 7). Desse modo, foi verificado que a estimulação dos macrófagos por LPS não alterou significativamente a viabilidade celular.

Outro resultado importante observado foi o de que as frações de acetato de etila, tanto da *A. triplinervia* e quanto da *A. glandulosa*, são mais citotóxicas para os macrófagos do que os extratos metanólicos das respectivas plantas. Conforme a concentração das frações aumenta, a queda da viabilidade é mais intensa. Contudo, de modo análogo aos extratos, a viabilidade dos macrófagos na presença das frações de ambas as plantas é semelhante, variando de 28,66 - 96,69% para a *A. triplinervia* e de 27,13 - 97,97% para a *A. glandulosa* (Tabela 7).



**Figura 11: Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos aderentes previamente incubados na presença de meio de cultura (RPMI-1640C) contendo  $1 \mu\text{g/mL}$  de solução de lipopolissacarídeo de *E. coli* – LPS (Difco) e as preparações obtidas dos extratos por 24 horas. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 12: Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos aderentes previamente incubados na presença de meio de cultura (RPMI-1640C) contendo  $1 \mu\text{g/mL}$  de solução de lipopolisacarídeo de *E. coli* – LPS (Difco) e as preparações obtidas das frações por 24 horas. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle.

**Tabela 7:** Viabilidade dos macrófagos peritoneais estimulados com LPS (1 µg/mL) na presença das preparações obtidas dos extratos e frações da *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa* em diferentes concentrações.

**VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS (%)**

EXTRATOS E FRAÇÕES (µg/mL)	7,81	15,62	31,25	62,50	125	250	500
<i>A. triplinervia</i> (ext. metanólico)	96,95 ± 6,10	95,56 ± 4,23	93,53 ± 4,77	85,43 ± 2,85*	77,66 ± 5,68*	60,38 ± 6,31*	43,44 ± 2,98*
<i>A. glandulosa</i> (ext. metanólico)	93,45 ± 3,70	91,45 ± 5,67**	84,90 ± 4,41*	74,40 ± 5,77*	71,95 ± 6,41*	58,62 ± 1,27*	41,23 ± 2,38*
<i>A. triplinervia</i> (fr. acetato de etila)	96,69 ± 4,39	91,96 ± 6,03	84,56 ± 6,70*	78,19 ± 8,12*	67,56 ± 4,19*	53,10 ± 1,45*	28,66 ± 4,46*
<i>A. glandulosa</i> (fr. acetato de etila)	97,97 ± 2,36	92,50 ± 1,83*	85,03 ± 2,57*	76,82 ± 1,03*	64,22 ± 2,97*	45,25 ± 3,11*	27,13 ± 5,28*

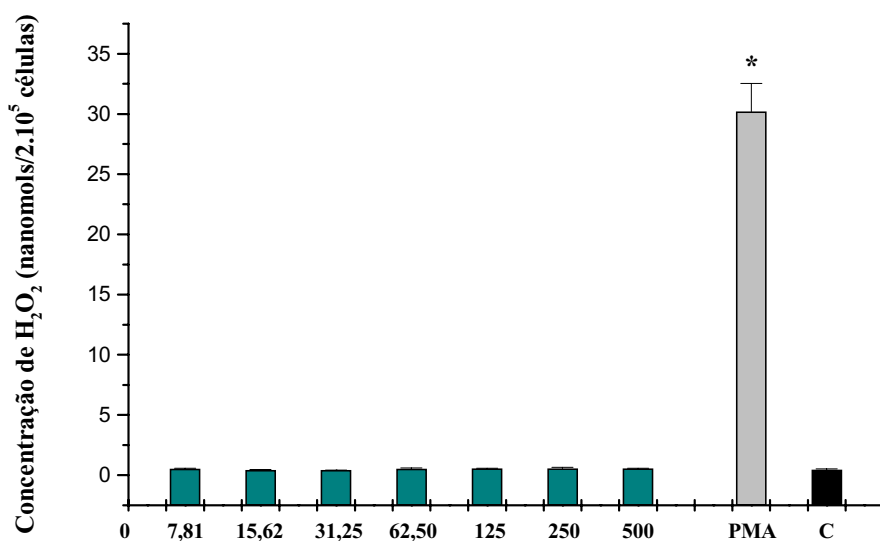
Avaliação realizada após 24 horas de incubação. A viabilidade dos macrófagos peritoneais, somente na presença de LPS (1 µg/mL), foi de 97,61 ± 3,21%. Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

\* p<0,01, \*\* p<0,05 quando comparados ao controle (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

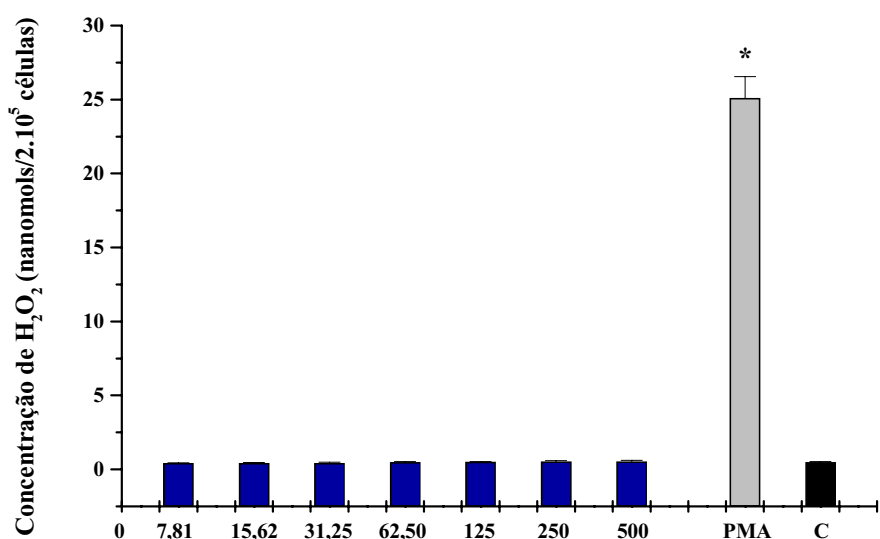
### **4.3. Avaliação da estimulação de macrófagos**

#### **4.3.1. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Os extratos metanólicos das plantas, em todas as concentrações testadas, não induziram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13).



*A. triplinervia* - Extrato metanólico (µg/mL)



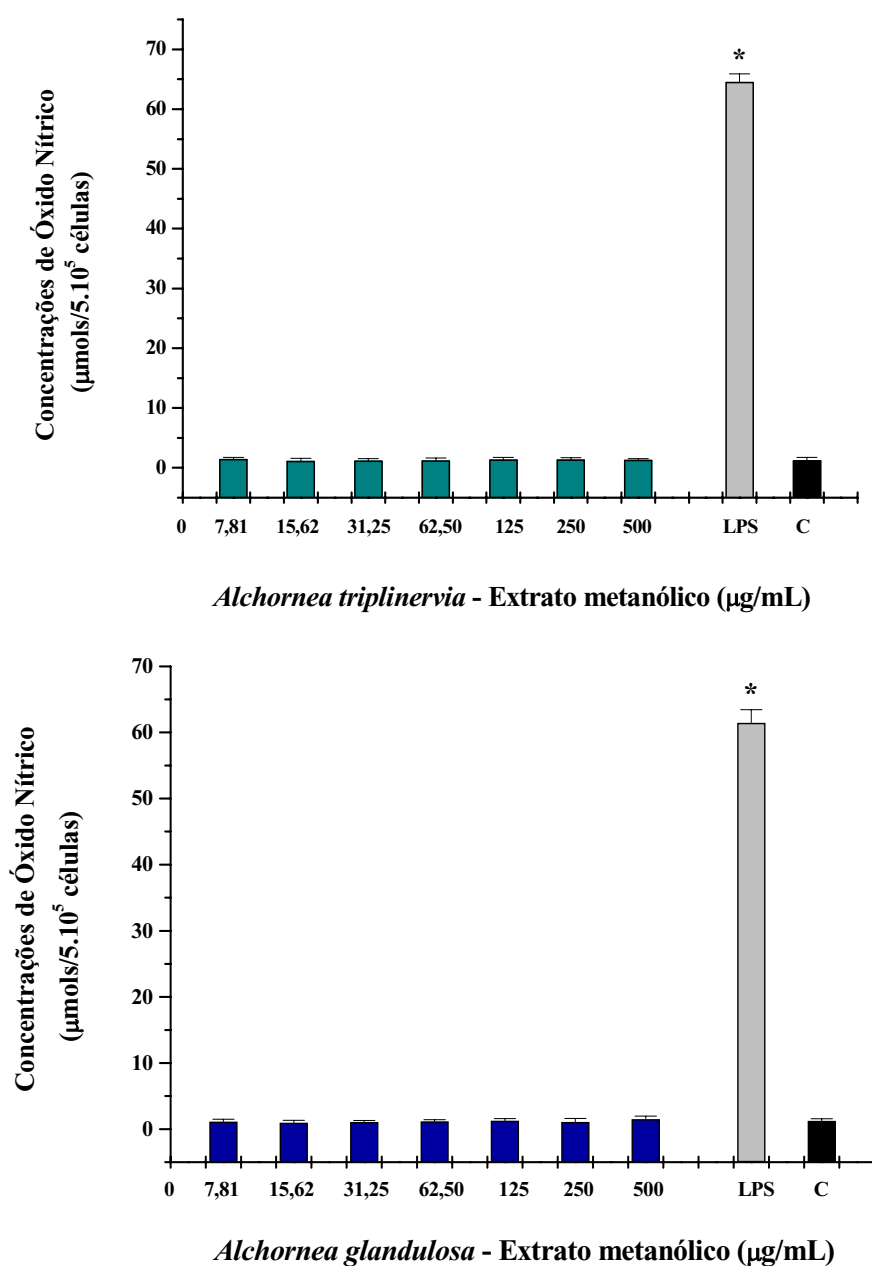
*Alchornea glandulosa* - Extrato metanólico (µg/mL)

**Figura 13: Produção de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados em solução de vermelho de fenol juntamente com as preparações obtidas dos extratos por 1h. PMA (0,2µM) foi utilizado como controle positivo e apenas células em tampão como controle negativo (C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle negativo (C).

#### **4.3.2. Determinação de óxido nítrico (NO)**

Os extratos metanólicos das plantas, em todas as concentrações testadas, não induziram a produção de NO (Figura 14).

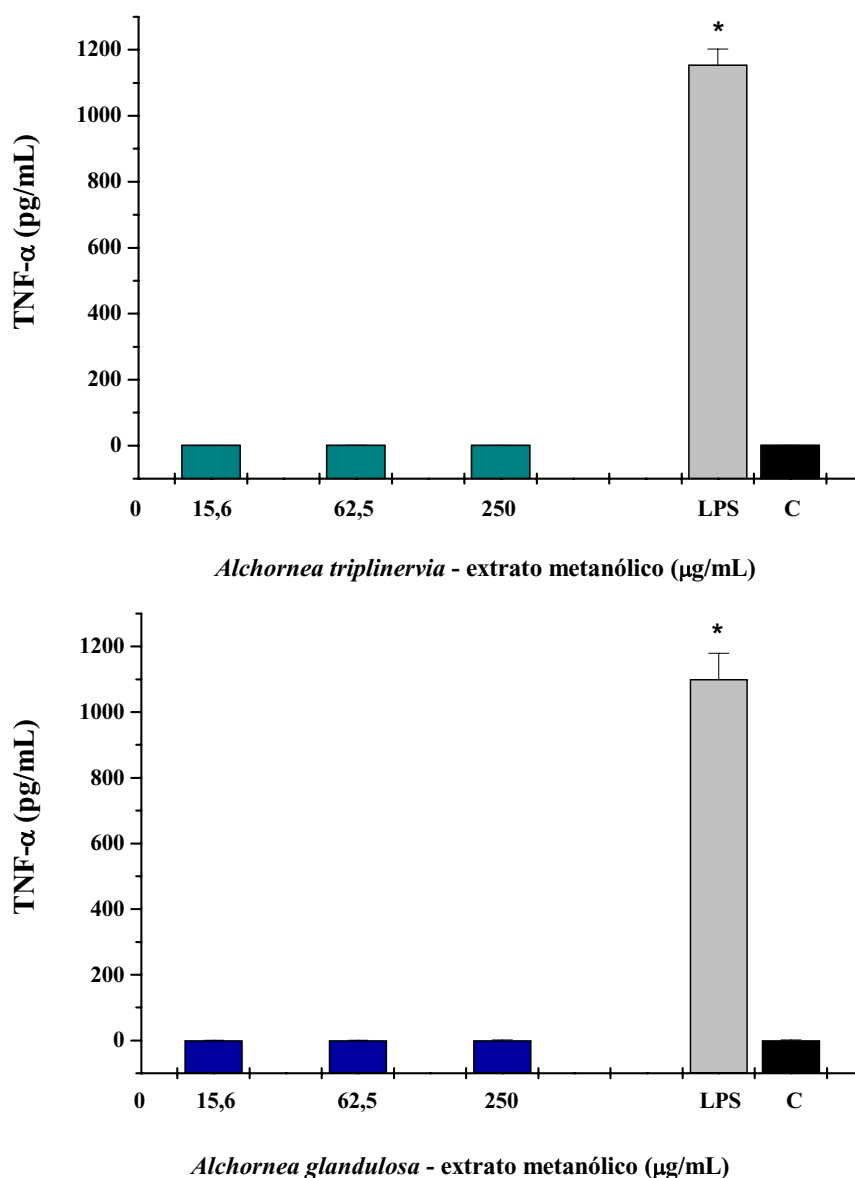


**Figura 14: Produção de Óxido Nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa*.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados por 24h na presença das preparações obtidas dos extratos. Aliquotas dos sobrenadantes das culturas foram misturadas com mesmo volume do reagente de Griess. Solução de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) foi utilizada como controle positivo e apenas células em meio de cultura (RPMI-1640) como controle negativo (C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnett.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle negativo (C).

### **4.3.3. Determinação do TNF- $\alpha$**

Os extratos metanólicos das plantas, em todas as concentrações testadas, não induziram a produção de TNF- $\alpha$  (Figura 15).



**Figura 15: Produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa*.** As células peritoneais foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. RPMI-1640-C e os extratos das plantas foram adicionados aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Após incubação de 24h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e testados quanto à presença de TNF- $\alpha$  utilizando teste imunoenzimático ELISA. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 $\mu$ g/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle negativo (C).

#### **4.4. Determinação da atividade inibitória dos extratos e frações de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$ .**

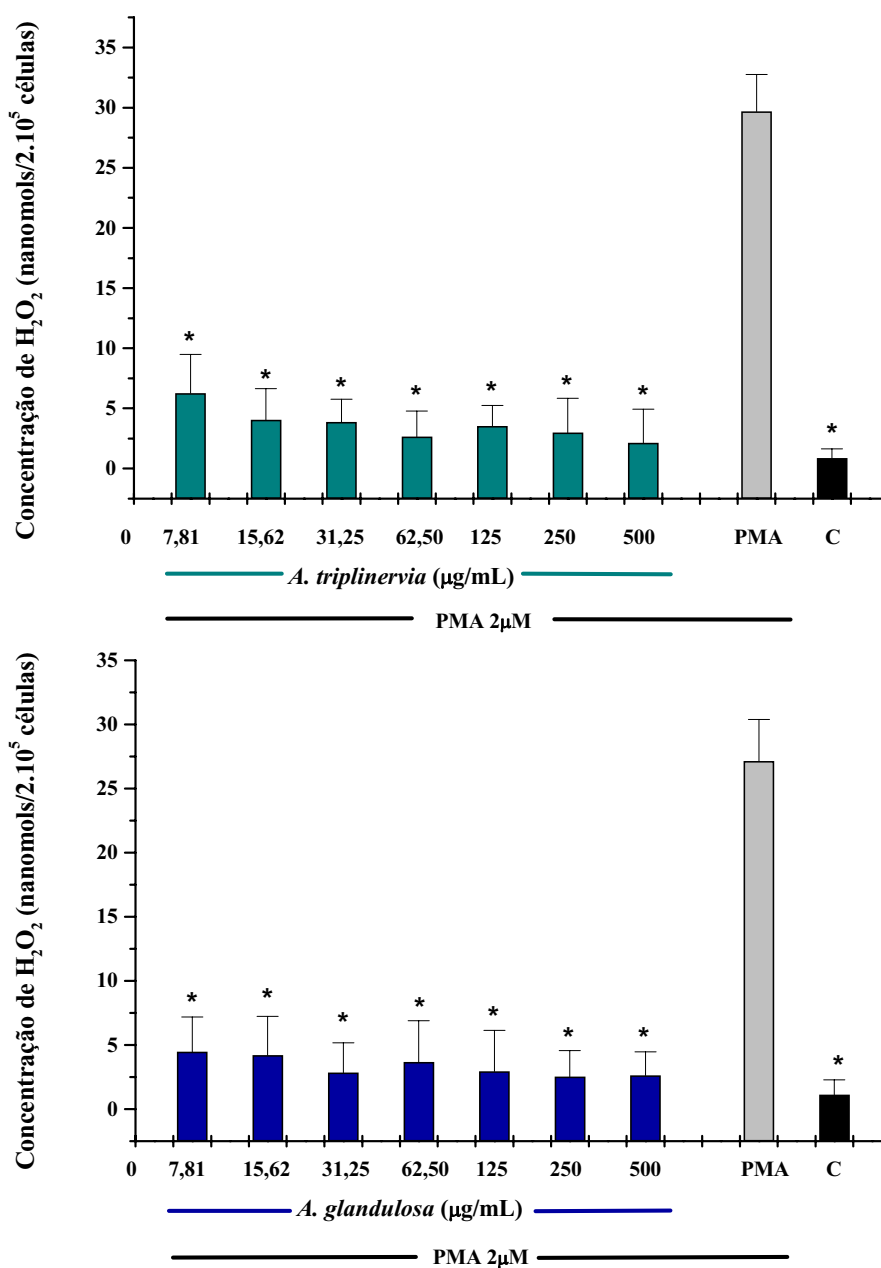
##### **4.4.1. Quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Nas Figuras 16 e 17, pode ser observado que tanto os extratos metanólicos quanto as frações acetato de etila de ambas as plantas são fortes inibidores da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em macrófagos estimulados por PMA.

Uma inibição mais acentuada ocorre quando os extratos são utilizados. A porcentagem de inibição dos extratos varia de 81,93% a 95,67%, enquanto que a das frações varia de 63,83% a 77,23% (Tabela 8).

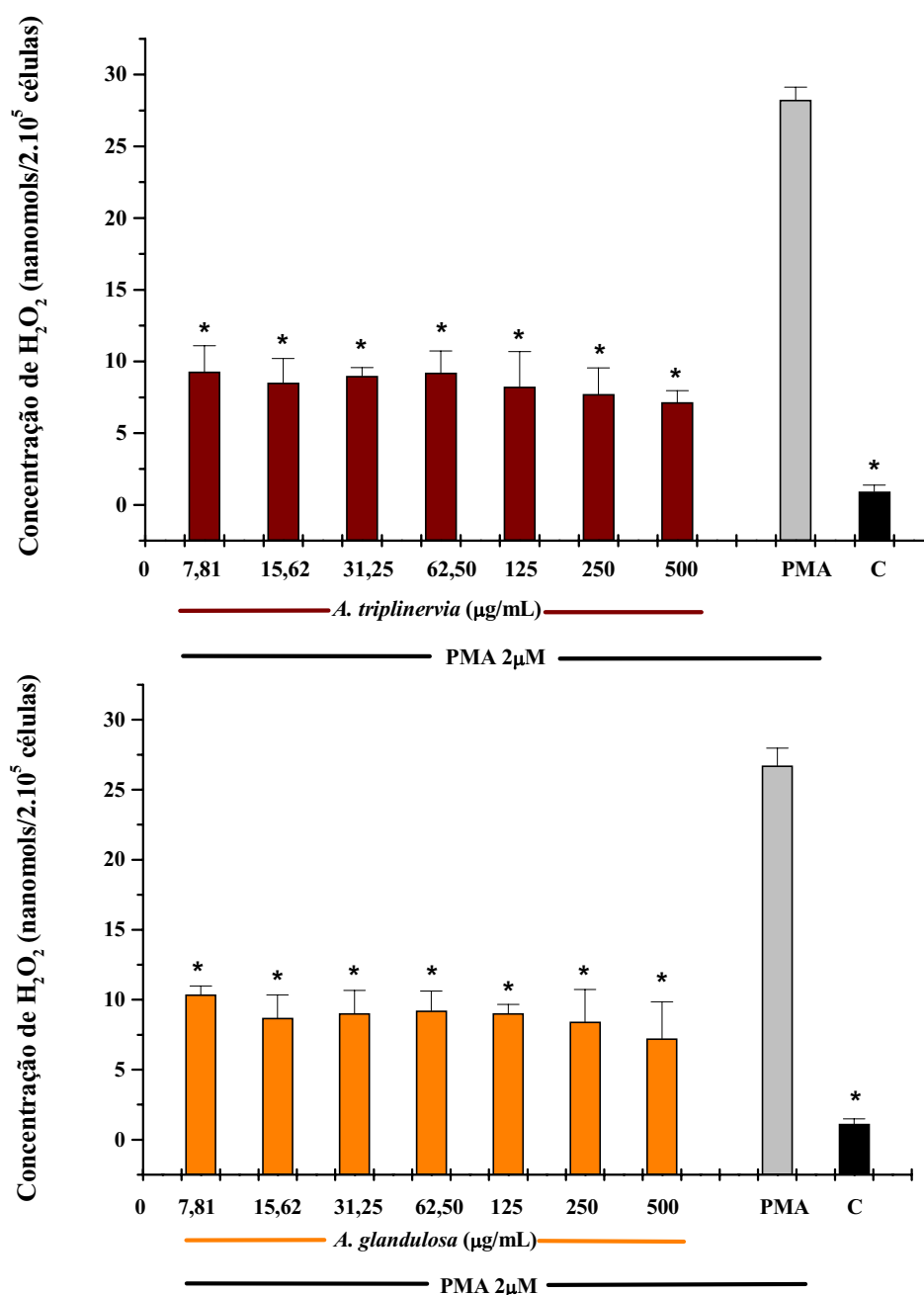
Analisando-se cada figura, é possível notar que os valores de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são semelhantes em todas as concentrações testadas, não variando com o aumento da concentração.

Novamente, as duas plantas apresentaram resultados similares.



**Figura 16: Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por PMA.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados em solução de vermelho de fenol juntamente com PMA a 0,2µM e as preparações obtidas dos extratos por 1h. Solução de PMA, sem a presença de extrato, foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo (C), foram utilizadas apenas células em tampão. Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\* p<0,01 quando comparado ao controle positivo (PMA).



**Figura 17:** Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por PMA. Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados em solução de vermelho de fenol juntamente com PMA a 0,2µM e as preparações obtidas das frações por 1h. Solução de PMA, sem a presença das frações, foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo (C), foram utilizadas apenas células em tampão. Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\* p<0,01 quando comparado ao controle positivo (PMA).

**Tabela 8.** Efeito inibitório das preparações obtidas dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em macrófagos estimulados por PMA.

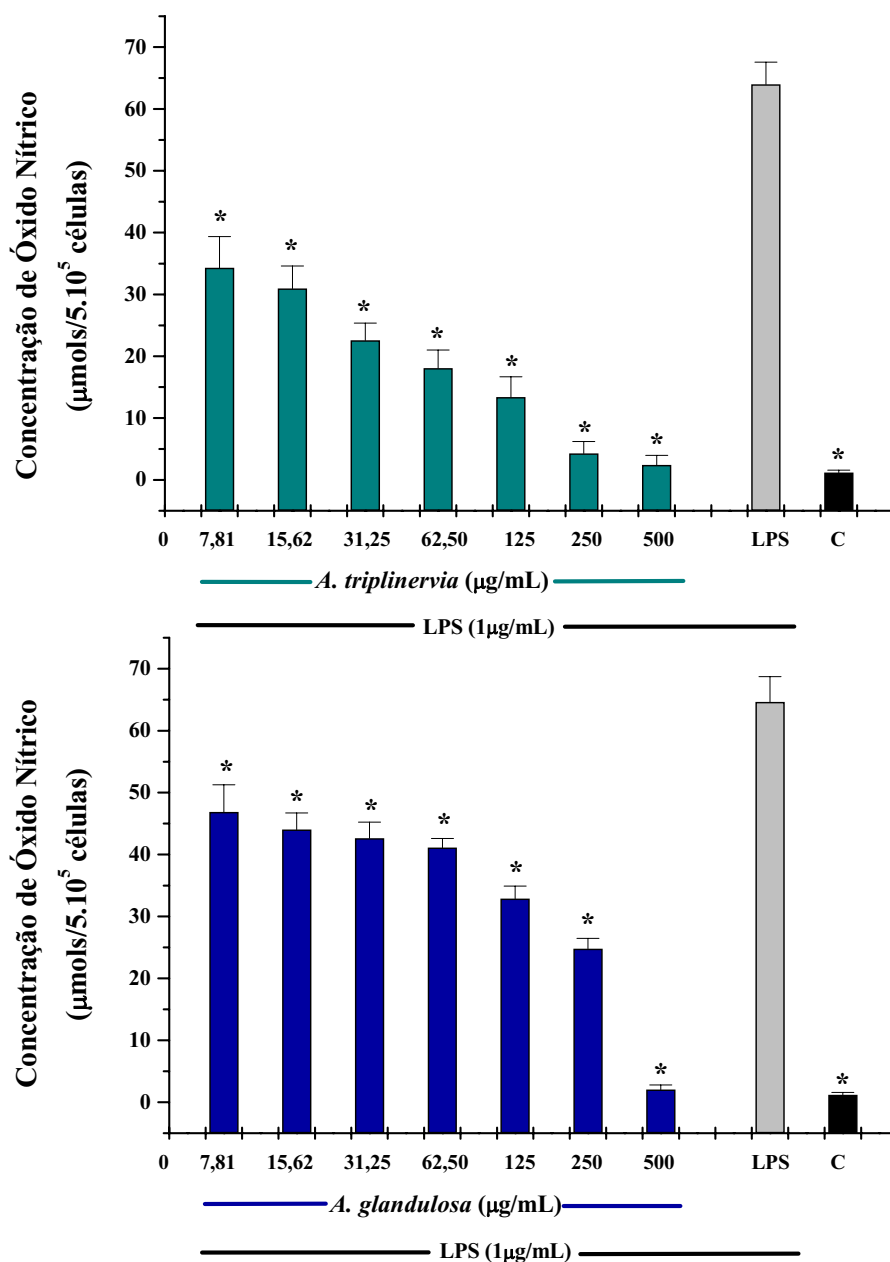
INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (%)							
EXTRATOS (µg/mL)	7,81	15,62	31,25	62,50	125	250	500
<i>A. triplinervia</i> <i>metanólico</i>	81,93 ± 9,25	88,35 ± 12,17	89,80 ± 7,60	94,05 ± 5,20	91,11 ± 4,15	92,97 ± 8,47	95,67 ± 7,61
<i>A. glandulosa</i> <i>metanólico</i>	86,04 ± 9,92	88,62 ± 16,26	93,99 ± 9,048	88,93 ± 12,97	92,12 ± 10,05	95,18 ± 8,70	94,371 ± 9,60
<i>A. triplinervia</i> <i>acetato de etila</i>	69,31 ± 6,25	72,25 ± 4,68	70,47 ± 3,82	69,64 ± 4,21	73,08 ± 7,77	74,98 ± 7,97	77,23 ± 3,45
<i>A. glandulosa</i> <i>acetato de etila</i>	63,83 ± 4,86	70,56 ± 4,16	69,03 ± 7,29	68,38 ± 5,89	69,09 ± 2,42	71,35 ± 10,26	75,88 ± 12,48

Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

#### 4.4.2. Quanto à produção de NO

As Figuras 18 e 19 mostram que ocorre alta produção de NO pelos macrófagos estimulados por LPS quando o extrato ou a fração não está presente, contudo essa produção é reduzida na presença dos extratos e frações de ambas as plantas. Esses resultados demonstram que tanto os extratos quanto as frações das plantas são potentes inibidores da produção de NO em macrófagos ativados por LPS.

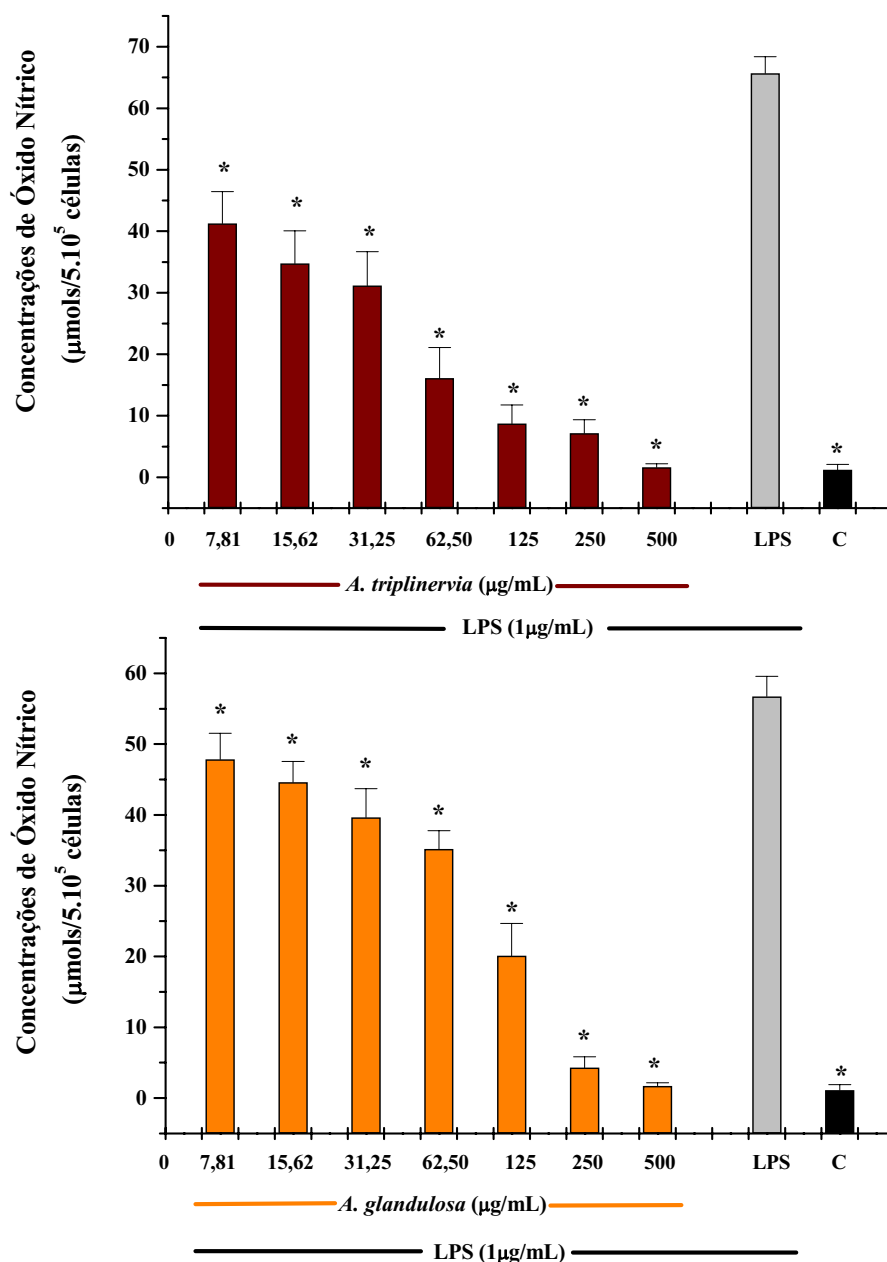
Pode ser observado também que a inibição da produção de NO é dependente da concentração, pois quanto maior a concentração de extrato ou fração presente no meio, maior a inibição do NO. Através deste experimento, é possível notar que a *A. triplinervia*, tanto na forma de extrato quanto na forma de fração, possui maior capacidade de inibir a produção de NO do que a *A. glandulosa* (Tabela 9).



**Figura 18: Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.**

Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de meio de cultura (RPMI-1640C) contendo  $1 \mu\text{g/mL}$  de solução de lipopolisacarídeo de *E. coli* – LPS (Difco) e as preparações obtidas dos extratos por 24 horas. Solução de LPS, sem a presença de extrato, foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo (C), foram utilizadas apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle positivo (LPS).



**Figura 19: Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.** Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de meio de cultura (RPMI-1640C) contendo  $1 \mu\text{g/mL}$  de solução de lipopolissacarídeo de *E. coli* – LPS (Difco) e as preparações obtidas das frações por 24 horas. Solução de LPS, sem a presença das frações, foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo (C), foram utilizadas apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnett.

\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle positivo (LPS).

**Tabela 9.** Efeito inibitório das preparações obtidas dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de NO em macrófagos estimulados por LPS.

INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (%)							
EXTRATOS (µg/mL)	7,81	15,62	31,25	62,50	125	250	500
<i>A. triplinervia</i> <i>metanólico</i>	47,30 ± 6,88	52,54 ± 5,08	65,94 ± 3,74	73,02 ± 5,33	80,51 ± 5,64	94,99 ± 3,29	98,19 ± 2,03
<i>A. glandulosa</i> <i>metanólico</i>	27,70 ± 9,65	32,40 ± 4,70	34,52 ± 6,13	36,88 ± 4,37	50,02 ± 2,82	62,55 ± 5,37	98,60 ± 1,81
<i>A. triplinervia</i> <i>acetato de etila</i>	38,05 ± 5,46	47,80 ± 8,96	53,60 ± 7,53	76,77 ± 8,11	88,34 ± 4,46	90,89 ± 3,98	99,36 ± 1,74
<i>A. glandulosa</i> <i>acetato de etila</i>	16,06 ± 3,65	21,67 ± 6,43	30,67 ± 8,02	38,73 ± 3,90	65,61 ± 9,76	94,23 ± 2,96	98,92 ± 1,36

Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

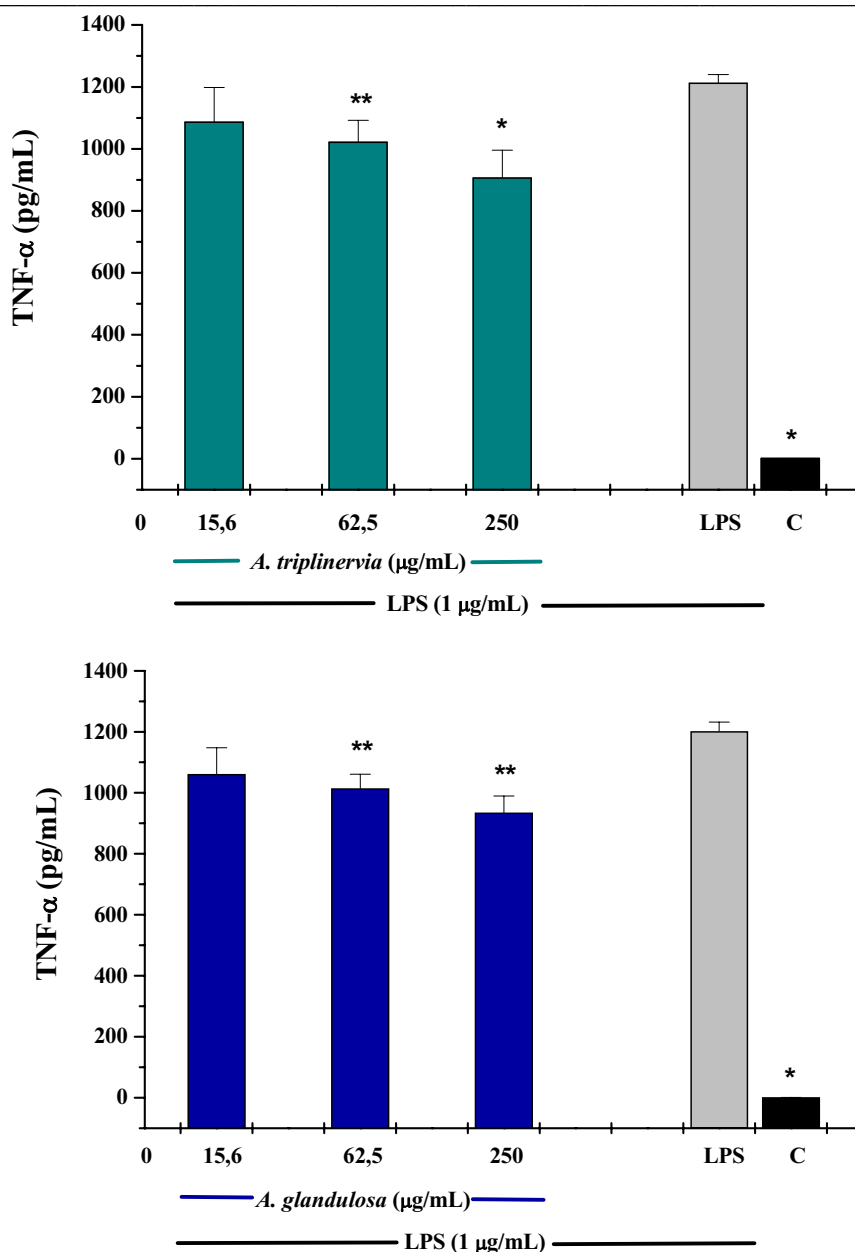
#### 4.4.3. Quanto à produção de TNF- $\alpha$ .

Nas Figuras 20 e 21, observa-se que os extrato e frações das plantas *A. trilinevia* e *A. glandulosa* são capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$ .

A inibição da produção de TNF- $\alpha$  não é tão intensa quanto a inibição da produção de NO, entretanto a porcentagem de inibição varia de 10,41% a 25,30%. Os valores encontrados são estatisticamente significativos quando comparados ao LPS (Tabela 10).

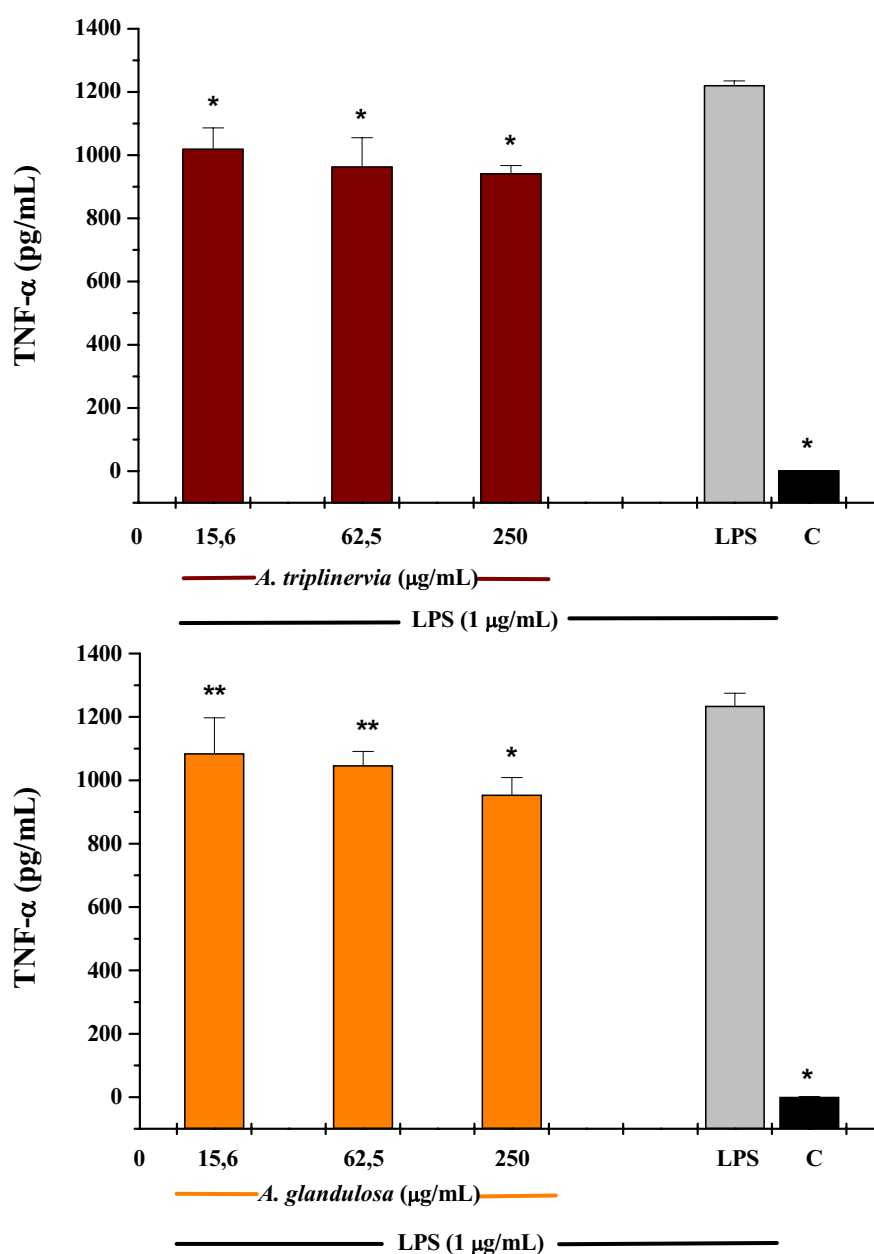
Da mesma maneira que na inibição do NO, a inibição do TNF- $\alpha$  é concentração dependente, isto é, a porcentagem de inibição aumenta com o aumento da concentração dos extratos e frações.

Os valores encontrados nesse teste de inibição mostram que os extratos e as frações das duas plantas possuem capacidades inibitórias semelhantes com relação a citocina TNF- $\alpha$ .



**Figura 20: Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.** As células peritoneais foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. RPMI-1640-C, extratos e LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) foram adicionados simultaneamente aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Após incubação de 24h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e testados quanto à presença de TNF- $\alpha$  utilizando teste imunoenzimático ELISA. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS ( $1\mu\text{g/mL}$ ) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet.

\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$  quando comparados ao controle positivo (LPS).



**Figura 21: Efeito das diferentes concentrações da fração acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.** As células peritoneais foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. RPMI-1640-C, frações e LPS (1  $\mu$ g/mL) foram adicionados simultaneamente aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Após incubação de 24h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e testados quanto à presença de TNF- $\alpha$  utilizando teste imunoenzimático ELISA. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 $\mu$ g/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnett.

\* p < 0,01, \*\* p < 0,05 quando comparados ao controle positivo (LPS).

**Tabela 10.** Efeito inibitório das preparações obtidas dos extratos metanólicos e frações acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados por LPS.

<b>INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF-<math>\alpha</math> (%)</b>				
<b>EXTRATOS (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>15,62</b>	<b>62,50</b>	<b>250</b>	
<i>A. triplinervia</i> <i>metanólico</i>	10,41 $\pm$ 7,77	15,62 $\pm$ 7,47	25,30 $\pm$ 6,38	
<i>A. glandulosa</i> <i>metanólico</i>	11,61 $\pm$ 9,44	15,54 $\pm$ 6,06	22,23 $\pm$ 2,53	
<i>A. triplinervia</i> <i>acetato de etila</i>	16,41 $\pm$ 6,38	21,02 $\pm$ 8,67	22,79 $\pm$ 2,62	
<i>A. glandulosa</i> <i>acetato de etila</i>	12,21 $\pm$ 6,23	15,16 $\pm$ 0,96	22,61 $\pm$ 5,55	

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

---

## ***V - DISCUSSÃO***

Os produtos naturais têm sido considerados uma extraordinária fonte de medicamentos (SEIDL, 1999). A química orgânica produz um número crescente de compostos sintéticos para uso medicinal, contudo importantes medicamentos da medicina moderna ainda são extraídos de plantas medicinais (WIJESEKERA, 1991).

Espécies do gênero *Alchornea* estão presentes na Floresta Atlântica do Sul e Sudeste do Brasil e também na Amazônia (TABARELLI e MANTOVANI, 1999; TAYLOR et al., 1998). Sabe-se que plantas da floresta tropical representam uma rica fonte de substâncias potencialmente imunomodulatórias (WILLIAMS, 2001).

Neste trabalho, foi realizado estudo biológico de plantas do gênero *Alchornea* (Euphorbiaceae), mais especificamente *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa*, buscando a pesquisa de substâncias que atuem no sistema imunológico, justificando dessa forma o uso na medicina popular.

A escolha das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* para a realização desta pesquisa foi guiada por análises etnofarmacológicas. Alguns estudos indicam que, se a seleção das plantas é feita baseada no uso tradicional, as possibilidades de sucesso da pesquisa são maiores (TROTTER et al., 1982; ELISABETSKY e WANNMACHER, 1993). Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (YUNES e CALIXTO, 2001).

O estudo fitoquímico dessas espécies de *Alchornea* foi realizado no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela pós-graduanda Tamara Regina Calvo, sob orientação do Prof. Wagner Vilegas. A maioria dos compostos encontrados na *A. glandulosa* são compostos fenólicos, como derivados do ácido gálico e majoritariamente flavonoides com uma unidade de açúcar, além da presença de alcalóides guanidínicos. A planta *A. triplinervia* ainda está sendo estudada no momento (item 4.1.).

O fracionamento do extrato metanólico obtido das folhas de *A. glandulosa* por Conegero et al. (2003) resultou no isolamento de uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, da loliolida, do alcalóide guanidínico *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina e da corilagina. Os autores citam que embora a loliolida já tenha sido isolada de outras plantas e organismos marinhos, esse representa o primeiro relato da ocorrência dessa substância no gênero *Alchornea* e na família Euphorbiaceae. Várias propriedades biológicas reportadas para essa substância são mencionadas pelos autores, incluindo atividades como repelente, inibidora de germinação, imunossupressora e citotóxica contra carcinoma humano de nasofaringe (KB) e leucemia linfóide (P388). Eles ainda ressaltam estudos com cepas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* onde foram demonstrados que alcalóides que contêm unidades isopentenílicas, como no caso do alcalóide *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina, são potenciais agentes antitumorais.

Em um artigo recentemente publicado, galato de etila, ácido gálico, quercetina, kaempferol-3-*O*-L-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-L-ramnosídeo e miricetina-3-*O*-L-ramnosídeo foram isolados e identificados da fração acetato de isopropila obtida a partir do extrato etanólico das folhas da *A. glandulosa* (URREA-BULLA et al., 2004). Na *A. triplinervia*, já foram encontrados os seguintes compostos: ácido gálico, amentoflavona,  $\beta$ -D-glucogalina, galato de metila e isocorilagina (BRACA et al., 2002).

Na procura por princípios ativos, o mais importante não é encontrar o composto mais fácil de separar, ou aquele que se encontra em maior concentração, ou ainda, o que possui a estrutura de maior complexidade. O que realmente interessa é descobrir compostos que apresentem atividade biológica. Daí a importância e necessidade de estudos fitoquímicos guiados pelos bioensaios, sejam eles *in vivo* ou *in vitro* (YUNES e CALIXTO, 2001). Além disso, estudos fitoquímicos de algumas plantas permitiram um grande avanço nas pesquisas de novos fármacos

ao fornecerem também substâncias protótipo para o desenho de fármacos mais eficientes em determinados alvos moleculares (YUNES et al., 2001).

Atualmente, dezenas de milhares de produtos naturais têm sido descritos na literatura, mas em um mundo tão diversificado, onde nós nem sequer estamos perto de documentar todas as espécies existentes, certamente muitos outros milhares de compostos estão esperando para serem descobertos (CANNELL, 1998).

Primeiramente neste trabalho, o extrato metanólico foi analisado. Segundo Yunes e Calixto (2001), o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Um aspecto que deve ser observado é que o estudo químico-biológico de plantas medicinais deve ser seguido, fundamentalmente, pelos resultados que indicam uma certa atividade de interesse. As frações acetato de etila, obtidas a partir do extrato metanólico, só foram utilizadas em experimentos onde previamente já haviam sido obtidos resultados positivos durante os ensaios com o referido extrato.

Os estudos das ações das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa*, no sistema imunológico murino, foram iniciados com os testes de viabilidade. Uma vez que as células são retiradas de seu ambiente natural *in vivo* e entram em contato com substâncias a serem testadas, a questão da viabilidade é fundamental, principalmente durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando dessa forma a capacidade de uma determinada população celular responder a vários estímulos, quaisquer que sejam eles (FRESHNEY, 1994). Estudos *in vitro* são importantes quando se dispõe de pequenas quantidades do material vegetal. Além disso, nesses testes as variáveis experimentais podem ser mais facilmente controladas, facilitando a reprodutibilidade dos ensaios (YUNES e CALIXTO, 2001).

A avaliação da toxicidade do DMSO sobre culturas de macrófagos foi realizada uma vez que os extratos e frações foram inicialmente solubilizados nesse solvente (Figura 7). Devido à

alta toxicidade observada com a utilização do DMSO, apenas uma quantidade mínima foi utilizada, evitando assim que esse solvente interferisse nos experimentos. Pelos resultados encontrados, foi possível observar que até 2% de DMSO poderiam ser empregados para a solubilização dos extratos e frações, embora nos experimentos aqui relatados no máximo 0,5% de DMSO tenha sido utilizado.

A etapa seguinte foi a observação do potencial citotóxico dos extratos metanólicos e/ou das frações acetato de etila das plantas, em macrófagos estimulados ou não por LPS ou PMA (Figuras 8-12 e Tabelas 5-7). Os valores de citotoxicidade encontrados demonstraram que o potencial citotóxico dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila em culturas de macrófagos peritoneais é dependente da concentração, ou seja, a viabilidade dos macrófagos diminui com o aumento da concentração. Foi observado ainda que as frações acetato de etila são mais citotóxicas do que os extratos metanólicos. Os resultados observados estão de acordo com outros trabalhos, nos quais uma citotoxicidade notável não foi observada quando foram utilizadas concentrações variando de 500 a 15,6µg/mL da fração pigmentada de *Oryza sativa* L. *indica* (HU et al., 2003). Concentrações de 500 e 100µg/mL do extrato etanólico de *Boerhaavia diffusa* também obtiveram bons níveis de viabilidade, assim permitindo a avaliação das propriedades imunomodulatórias (MEHROTRA et al., 2002).

O sistema imunológico é um mecanismo complexo de defesa do organismo. A pesquisa básica das substâncias naturais com propriedades imunomodulatórias pode ser feita através de ensaios de estimulação da imunidade inespecífica, como por exemplo, a eficiência dos granulócitos, macrófagos, sistema complemento, células *natural killer* (NK) e seus efeitos sobre a fagocitose, proliferação linfocitária, migração de linfócitos T, ativação de macrófagos, etc. Outras

pesquisas mais recentes na área de substâncias imunomodulatórias incluem a produção de citocinas pelos macrófagos, como por exemplo, o estudo do TNF- $\alpha$  (WILLIAMS, 2001).

Entre os produtos secretados pelos macrófagos, estão os reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994). Espécies reativas do oxigênio podem ter papéis diferentes na célula, dependendo de suas concentrações relativas e também do acesso aos sítios celulares (RAMASARMA, 1990). Um severo *stress* oxidativo está associado a disfunções celulares, resultando na ativação de mecanismos de reparo, apoptose e até necrose das células (FORMAN e TORRES, 2001).

O óxido nítrico tem um duplo papel no processo inflamatório. O NO secretado em altos níveis por macrófagos ativados é importante na defesa contra vírus, bactérias, fungos e células tumorais (CROEN, 1993; MacMICKING, 1997). Por outro lado, os efeitos pró-inflamatórios do NO parecem ser mediados pela sua produção exagerada e estão relacionados a várias doenças como o choque séptico, doenças auto-imunes, arteriosclerose (MONCADA, 1991). Por esse motivo, o NO é um mediador atualmente conhecido como “faca de dois gumes”, pois pode exercer efeitos benéficos ou prejudiciais dependendo do contexto patofisiológico (CIRINO et al., 2002).

Na produção de NO pelos macrófagos, o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pode ser requerido como um primeiro sinal, antes que essas células sejam deflagradas por um segundo sinal, como por exemplo, LPS, ésteres de forbol ou TNF- $\alpha$  (JUN et al., 1994; KIM e MOON, 1996; NATHAN, 1992). O TNF- $\alpha$  é uma citocina multifuncional que possui funções centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. Essa molécula ainda tem a capacidade de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e várias quimiocinas (PALLADINO et al., 2003). Dependendo das condições experimentais ou do

modelo de doença, o efeito do TNF- $\alpha$  pode ser benéfico ou prejudicial. O TNF- $\alpha$  está envolvido em numerosas atividades pró-inflamatórias e também na resistência a várias infecções (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994).

A avaliação da estimulação de macrófagos foi realizada através de três experimentos: produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. Os experimentos feitos, sem a ativação de macrófagos com LPS ou PMA, mostraram que as plantas não induziram a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou NO (Figuras 13 e 14). Utilizando o método de ELISA de captura, foi observado também que as plantas não liberaram TNF- $\alpha$  (Figura 15). Portanto, do ponto de vista desses mediadores, as plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* não possuem propriedades imunoestimulantes.

Diante desses resultados, restava uma dúvida. Se as plantas não possuíam atividades imunoestimulantes, poderiam estar promovendo um efeito supressor no sistema imunológico murino, ou não apresentariam nem atividades estimulantes nem supressivas?

Na segunda etapa deste trabalho, foram avaliadas as capacidades das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* inibirem a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$ . Para esse estudo os mesmos testes imunológicos foram utilizados, contudo os macrófagos foram estimulados com PMA ou LPS, conforme os testes realizados.

Os macrófagos têm um importante papel tanto na imunidade inata quanto na adquirida. Eles podem ser estimulados por citocinas e por componentes microbianos como o LPS (ADAMS e HAMILTON, 1984).

A estrutura do LPS é anfipática, composta de uma porção polissacarídica covalentemente ligada à região hidrofóbica do lipídeo A. As respostas celulares dos macrófagos ao LPS são numerosas, praticamente cada aspecto da fisiologia dessas células é de algum modo influenciada

pelo LPS. O LPS induz a um aumento no consumo de glicose e oxigênio e então as células adquirem alta capacidade funcional, como a capacidade de matar microorganismos e células tumorais. Desse modo, os macrófagos desenvolveram um eficiente mecanismo para o reconhecimento do LPS no ambiente e, como consequência, esse componente das bactérias Gram-negativas está entre os mais potentes estimuladores de macrófagos. Em muitos casos, uma quantidade pequena como 1pg/mL induz resposta mensurável (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994).

As moléculas de LPS são liberadas após a bacteriólise ou durante períodos de rápida proliferação bacteriana. Estão relacionados a várias respostas fisiopatológicas em infecções bacterianas severas causadas por Gram-negativos e inflamação generalizada. Contudo, o LPS é também um potente imunorregulador. No início da resposta de fase aguda, o lipídio A do LPS interage com a proteína CD14 que está presente nas células mononucleares e em outras células, como nos granulócitos, nas células endoteliais, etc. A ligação do LPS ao CD14 e a subsequente resposta celular são facilitadas pela proteína ligante do lipopolissacarídeo (LBP). O receptor CD14, liga-se ao complexo LBP-LPS, e é importante para a sinalização induzida pelo LPS. Contudo, existem várias células que não expressam CD14, e também são capazes de responder ao LPS. Esse fato pode, talvez, indicar a existência de receptores de LPS independente de CD14 (LANGHANS, 1996).

O PMA é um estimulante químico hidrofóbico que pode atravessar a membrana citoplasmática do fagócito independentemente de receptor e é capaz de se ligar e também ativar a proteína quinase C (PKC), causando uma grande variedade de efeitos nas células (BENDER et al., 1983; BLUMBERG, 1980). É uma substância que tem sido extensivamente estudada. O *stress* oxidativo induzido pelo PMA é um dos seus mecanismos de promoção tumoral (LU et al., 2004).

Os macrófagos são células que produzem e liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta à fagocitose ou à estimulação com vários agentes. A enzima responsável pela produção de superóxido e peróxido de hidrogênio é a NADPH oxidase (FORMAN e TORRES, 2001). Neste trabalho, o PMA foi utilizado como um indutor do *burst* oxidativo. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos macrófagos estimulados por PMA foi fortemente inibida tanto pelos extratos metanólicos quanto pelas frações acetato de etila de ambas as plantas (Figuras 16 e 17). O perfil de resposta das duas plantas foi semelhante, contudo os extratos são mais potentes que as frações, sugerindo uma ação sinérgica entre os constituintes presentes no extrato. Foi observado também que todas as concentrações testadas inibiram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não variando a porcentagem de inibição com a concentração utilizada (Tabela 8).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma molécula estável, mas com capacidade de reagir com o ubíquo íon ferroso (Fe<sup>2+</sup>) dos sistemas biológicos, produzindo o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), através da reação de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ ). Por isso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ser considerado um radical livre “encoberto” (YUNES e CALIXTO, 2001). Halliwell, em 1987, já sugeria que espécies reativas de oxigênio como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o  $\cdot\text{OH}$  estariam relacionadas com algumas patologias humanas, como a artrite reumatóide, injúria de reperfusão, trauma cerebral e isquemia.

LU et al. (2004) avaliaram os efeitos inibitórios das procianidinas presentes na *Vitis vinifera* no *stress* oxidativo induzido por carcinógenos. A inibição da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em polimorfonucleares (PMNs) estimulados com PMA foi estudada. Os resultados mostraram que a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos PMNs aumentou após a estimulação com PMA e que diferentes concentrações de procianidinas puderam inibir a liberação desse mediador. Os autores sugerem que as procianidinas das sementes de uva poderiam ser benéficas na quimioprevenção do câncer.

Benencia et al. (1999) observaram uma diminuição da capacidade fagocítica e do *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais murinos tratados com o extrato aquoso das folhas da *Trichilia glabra*. O *burst* oxidativo permite a geração de espécies reativas de oxigênio que podem ser detectadas através de um ensaio baseado na redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT). O extrato inibiu significativamente o *burst* oxidativo quando o PMA foi utilizado como estimulante. Os autores acreditam que os macrófagos são muito importantes na eliminação de patógenos, mas também podem causar danos teciduais devido à geração de espécies reativas de oxigênio tóxicas. Esses resultados foram importantes, pois demonstraram que a *T. glabra* possui atividades antiinflamatórias do mesmo modo que outras plantas pertencentes a essa mesma família.

Ramasarma (1990) mostrou que apesar de produção de  $H_2O_2$  ser um processo celular natural, sua geração em grandes quantidades induz à quebra da fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular. Radicais de oxigênio podem ter um importante papel como iniciadores de processos degenerativos, como dano ao DNA e mutação, os quais podem estar relacionados ao câncer, doenças cardíacas e envelhecimento (AMES, 1983). As espécies reativas de oxigênio demonstraram induzir a ativação do NF- $\kappa$ B, contudo os mecanismos não estão claramente compreendidos (FORMAN e TORRES, 2002).

O NO é uma molécula mensageira envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos incluindo a contração da musculatura lisa, a reatividade plaquetária, a neurotransmissão central e periférica e as ações citotóxicas de células imunológicas. Essa molécula é crucial para muitas funções fisiológicas e a sua liberação inapropriada está ligada a numerosas patologias (HOBBS et al., 1999). Nesta pesquisa realizada com as espécies de *Alchornea*, foi possível observar que a superprodução de NO, ocasionada pela estimulação dos macrófagos por LPS, foi marcadamente inibida pela ação dos extratos metanólicos e frações

acetato de etila das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* (Figuras 18 e 19). A porcentagem de inibição é alta (Tabela 9) e, ao contrário dos resultados com  $H_2O_2$ , é dependente da concentração. A planta *A. triplinervia* possui maior capacidade de inibir a produção de NO do que a *A. glandulosa*.

O NO não é um oxidante forte, porém essa molécula reage com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), levando à formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), os quais dramaticamente aumentam a toxicidade do NO e  $O_2^-$  isolados. O peroxinitrito é capaz de oxidar várias moléculas biológicas (ISCHIROPOULOS et al., 1996; LINARES et al., 2001; WANG et al., 2002).

A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. Várias evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o NO contribui para algumas condições patológicas como asma, artrite reumatóide, tuberculose, esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (CALABRESE et al., 2004; HAMID, 1993; HOOPER, 1997; MANNICK, 1996; NICHOLSON, 1996; SAKURAI, 1995; VODOVOTZ, 1996). Além dessas doenças, a falência cardíaca crônica está relacionada com a produção excessiva de NO pela iNOS e o excesso de NO é também um dos primeiros sinais de rejeição aos transplantes (DUSTING e MacDONALD, 1995).

Portanto, agentes que modulem a atividade do NO podem ter considerável valor terapêutico. Em particular aqueles capazes de reduzir a formação de NO, podem ser benéficos em estados patofisiológicos onde a produção excessiva desse mediador é um fator contribuinte, como é o caso das doenças inflamatórias (HOBBS et al., 1999).

O conhecimento existente do papel do NO nos estados fisiológicos e fisiopatológicos abriu uma gama de possibilidades, especialmente no entendimento dos mecanismos de ação de

medicamentos que modulam a ação desse mediador. A ativação da iNOS leva à produção de níveis micromolares de NO, quantidade muito maior do que o nível nanomolar gerado pela enzima constitutiva eNOS ou nNOS (ACHIKE e KWAN, 2003).

Para os imunologistas, a iNOS apresenta-se tanto como uma molécula benéfica quanto maléfica. Se por um lado o NO derivado da iNOS confere proteção contra muitas, mas não todas, bactérias intracelulares e parasitas, ele também ajuda a combater várias infecções virais e está envolvido no controle de tumores. Por outro lado, a iNOS também pode promover a angiogênese tumoral e metástase, e também destruição tecidual e doenças em vários modelos animais de autoimunidade (BOGDAN, 1998).

Contudo, a manipulação farmacológica de um mediador tão onipresente quanto o NO possui alguns problemas. A distribuição das diferentes isoformas de NOS está relacionada basicamente às suas respectivas funções. Portanto, a possibilidade de manipulação das concentrações de NO de uma maneira específica pode ser realizada através de agentes seletivos que modulem a atividade de uma ou mais isoenzimas. Um entendimento mais detalhado da síntese do NO deve proporcionar uma grande oportunidade de alcançar seletividade, particularmente se diferenças na utilização de cofatores, na transferência de elétrons e na expressão gênica puderem ser exploradas (HOBBS et al., 1999).

Portanto, seria de grande valor o desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos da iNOS para potencial uso terapêutico (WANG et al., 2002). Inibidores da NOS utilizados no tratamento de processos inflamatórios requerem alta especificidade para iNOS. Desse modo, podem funcionar como moduladores relativamente seguros do NO em várias condições patológicas (SHIN et al., 2004).

Compostos obtidos de plantas que interferem com a síntese de óxido nítrico, especialmente por inibirem a enzima iNOS, podem ser candidatos importantes para o desenvolvimento de drogas antiinflamatórias (YUNES e CALIXTO, 2001).

Grande atenção tem sido dada à molécula de óxido nítrico atualmente, sendo que vários experimentos utilizando extratos, frações ou substâncias puras obtidas de plantas mostraram interferir com a produção de óxido nítrico. O extrato padronizado de *Gingko biloba* (EGb 761) e a fração acetato de etila da *Cudrania tricuspidata* inibiram a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . Além disso, o EGb 761 também inibiu a expressão da iNOS nesses macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  (KOBUCHI et al., 1997; SEO et al., 2001). Alicina e ajoeno, dois compostos obtidos do alho (*Allium sativum*), inibiram a produção de NO e a expressão da iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (DIRSCH et al., 1998).

Vários sesquiterpenos e triterpenos isolados do extrato metanólico do rizoma da *Alisma orientale*, utilizado na medicina chinesa, mostraram atividade inibitória na produção de NO em macrófagos ativados por LPS. Além disso, alismol e alisol F, dois constituintes ativos do extrato, foram capazes de inibir a indução da iNOS (MATSUDA, 1999).

Ganju et al. (2003) também estudaram a *Emblica officinalis* (Euphorbiaceae) e *Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae) na tentativa de determinar seus efeitos imunomodulatórios na artrite induzida em ratos, em um modelo que se assemelha à artrite reumatóide humana. Uma significativa atividade antiinflamatória foi encontrada. A produção de NO dos animais tratados com as plantas foi significativamente menor quando comparada ao controle, sugerindo que um possível mecanismo para conter a progressão da artrite nesses animais pode ser devido à produção celular diminuída de NO, através da inibição da atividade da NOS. Contudo, os autores

sugerem que a atividade inibitória dessas plantas também se deva às suas propriedades antiinflamatórias e à capacidade de neutralizar o dano oxidativo induzido pelo NO, o que eventualmente auxilia na remodelagem das células.

Esses exemplos mostram o imenso potencial dos compostos isolados de plantas na descoberta de novos medicamentos. Por outro lado, também é importante a realização de estudos complementares, visando ao esclarecimento dos mecanismos de ação de compostos naturais, fator essencial que permite avaliar o potencial desses compostos no processo de descoberta de novos medicamentos (YUNES e CALIXTO, 2001).

Compostos capazes de impedir a atividade biológica do NO podem ser agrupados em seis categorias principais, de acordo com o mecanismo de ação. A primeira categoria inclui substâncias que previnem a entrada da L-arginina na célula e, desse modo, restringem a enzima NOS do seu substrato. Agentes que reduzem o suprimento de co-fatores necessários para essa enzima catalizar a oxidação da L-arginina, como seqüestradores de cálcio, inibidores da síntese de tetrahydrobiopterina (BH4) e antagonistas da calmodulina estão na segunda categoria. Na terceira categoria, estão os inibidores do fluxo de elétrons via NADPH/flavina e agentes que interferem com o heme. Os inibidores da expressão da NOS estão na quarta categoria, e as substâncias que previnem a ligação do substrato a NOS na quinta. Os seqüestradores de NO estão na última categoria (HOBBS et al., 1999).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que possui importantes efeitos biológicos em uma variedade de células, efeitos na maioria relacionados a processos imunomodulatórios e inflamatórios (CASALE et al., 1996). É também um mediador de vários estados patológicos incluindo o choque séptico, a inflamação aguda e crônica e a caquexia (COHEN et al., 1996). Devido ao fato observado de que a remoção do TNF- $\alpha$  pode prevenir o desenvolvimento de doenças, essa

citocina tem sido o foco de intensa pesquisa recentemente (GIBSON, 2004; METHE et al., 2004; TRACEY e CERAMI, 1994).

Resultados obtidos no presente estudo mostram que houve inibição parcial da produção de TNF- $\alpha$  pelos extratos e frações das plantas estudadas (Figura 20 e 21). A capacidade inibitória dos extratos e frações de ambas as plantas são semelhantes. A inibição também foi dependente da concentração (Tabela 10).

O TNF- $\alpha$  atua em sinergismo com o IFN- $\gamma$  na ativação macrofágica, especialmente na indução de NO (JANEWAY et al., 2000). Considerando a pequena inibição de TNF- $\alpha$  nos resultados desse trabalho, provavelmente pode estar ocorrendo uma inibição do IFN- $\gamma$ , o que de certa forma contribuiria com a diminuição da produção de NO observada.

A partir dos anos 80, tornou-se evidente que a regulação da citocina TNF- $\alpha$  deveria ser firmemente controlada. Sabe-se que o funcionamento do sistema imunológico é equilibrado pela atividade de mediadores pró-inflamatórios e antiinflamatórios. A atividade não regulada desses mediadores pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias sérias. Particularmente, o aumento da síntese de TNF- $\alpha$  está associado com o desenvolvimento da artrite reumatóide, artrite psoriática e com a doença inflamatória intestinal. A inibição da atividade do TNF- $\alpha$  nessas doenças tem tido grande sucesso (PALLADINO et al., 2003).

Em um estudo feito por Sandoval et al. (2000) observou-se que o extrato aquoso de unha de gato (*Uncaria tomentosa*) é um potente inibidor do TNF- $\alpha$ . Os autores acreditam que o mecanismo primário dessa ação antiinflamatória deva ser a imunomodulação via supressão da síntese de TNF- $\alpha$ .

A fração aquosa padronizada de *Phlebodium decumanum* (EXPLY-37R) inibiu a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, IFN- $\gamma$  ou ambos (PUNZÓN et al., 2003).

A expressão do gene de TNF- $\alpha$  em macrófagos murinos pode ser regulada em fases distintas. A inibição da síntese de TNF- $\alpha$  pode ser devida à inibição da transcrição, a diminuição da meia-vida do RNA mensageiro ou ainda através da inibição da tradução (MIJATOVIC et al., 1997).

A síntese de TNF- $\alpha$  em monócitos/macrófagos é ativada por LPS e outros estímulos. O LPS estimula a liberação do I $\kappa$ B do NF- $\kappa$ B citoplasmático, resultando no deslocamento do NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo (COHEN et al., 1996).

Um grande número de compostos naturais parece interferir com a cascata que leva à ativação do NF- $\kappa$ B. O efeito de muitos extratos brutos obtidos de fontes naturais pode ser agora explicado baseando-se no fato de que essas plantas contêm agentes reguladores do NF- $\kappa$ B, como os diterpenóides e as lactonas sesquiterpênicas. A sinalização envolvida na inibição da síntese de citocinas é complexa e existem muitas abordagens que podem efetivamente regular a expressão de TNF- $\alpha$  (PALLADINO et al., 2003).

Vários estimulantes conhecidos da NADPH oxidase também provocam a ativação do NF- $\kappa$ B, como é o caso do PMA (KAUL e FORMAN, 1996). De fato, muitos estudos estão agora sugerindo que espécies reativas de oxigênio podem regular a produção de citocinas em macrófagos através de mecanismos dependentes de NF- $\kappa$ B. Nas células de Kupffer, macrófagos residentes no fígado, a produção de TNF- $\alpha$  foi regulada pela ativação do NF- $\kappa$ B por ERO (ROSE et al., 2000). Agentes que bloqueiam a síntese de TNF- $\alpha$  e a ativação resultante do NF- $\kappa$ B

poderiam ser úteis como terapia auxiliar no tratamento de vários tipos de câncer (PALLADINO et al., 2003).

Estudos *in vivo* e *in vitro* suportam o conceito de que vários componentes derivados de plantas com propriedades antiinflamatórias podem exercer seus efeitos através da modulação do sistema de citocinas. Por exemplo, os flavonóides, pertencem a uma classe de compostos largamente distribuídos através do reino vegetal. Essa classe possui interessantes ações antiinflamatórias (CALIXTO et al., 2004).

O estudo fitoquímico realizado no laboratório de Química Orgânica, IQ, UNESP (item 4.1.) com *A. glandulosa* assinala que flavonóides com uma unidade de açúcar são os compostos majoritariamente encontrados. Esse resultado está de acordo com artigos que relacionam os flavonóides a radicais de oxigênio, inflamação e câncer, sugerindo que os resultados observados neste trabalho possam ser devidos à ação dessas substâncias.

Os flavonóides são compostos fenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas. Além de suprimirem a inflamação, atuam também na quimioprevenção do câncer e na proteção contra as doenças vasculares. Vários estudos sugerem que os flavonóides quercetina, resveratrol e miricetina possam atuar inibindo o NF- $\kappa$ B (HOLMES-McNARY e BALDWIN JR, 2000; TSAI et al., 1999). O resveratrol, encontrado no vinho tinto, pode inibir a atividade NF- $\kappa$ B e induzir a apoptose das células transformadas, reduzindo a mortalidade nas doenças coronarianas e em certos tipos de câncer. Esse componente quimiopreventivo atua bloqueando o início da inflamação e da oncogênese (HOLMES-McNARY e BALDWIN JR, 2000). Essa substância também mostrou forte efeito inibitório na expressão da iNOS e na geração de NO por macrófagos ativados (TSAI et al., 1999).

Flavonóides derivados de plantas cítricas foram avaliados quanto à sua capacidade de alterar a resposta inflamatória, através da supressão da expressão de citocinas em monócitos humanos. Os resultados mostraram que a expressão de TNF- $\alpha$  foi inibida nos monócitos estimulados por LPS (MANTHEY et al., 1999).

Middleton Jr. et al. (2000), em uma revisão realizada sobre os efeitos dos flavonóides nas células mamárias, mencionaram que poucos estudos com relação as ações dos flavonóides sobre a função dos macrófagos são encontrados. Contudo, os autores mostraram que a geração de radicais de oxigênio em monócitos do sangue periférico foi suprimida pela catequina. Além disso, a quercetina foi capaz de inibir a expressão do gene de TNF- $\alpha$ .

A capacidade de vários compostos polifenólicos presentes na dieta suprimirem a liberação de NO em cultura de astrócitos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  foi estudada em 1998 por Soliman e Mazzi. Dos 61 compostos testados, 36 mostraram efeitos supressores. A quercetina, morina, apigenina, catequina, ácido elágico, ácido cafeico, curcumina foram algumas das substâncias que exibiram efeitos supressores dose-dependente sobre a produção de NO. Esses resultados demonstram que compostos presentes na dieta são potencialmente úteis na inibição da produção excessiva de NO.

Vários artigos também indicam que extratos ou substâncias obtidas de plantas medicinais, inclusive flavonóides, são capazes de inibir simultaneamente a produção de NO e TNF- $\alpha$ .

Manjeet e Ghosh, em 1999, mostraram evidências de que a superprodução de NO e TNF- $\alpha$  por macrófagos ativados por LPS pode ser marcadamente inibida pela ação da quercetina, principal componente ativo da planta *Rhododendron cinnabarium*.

A morina é um flavonóide muito encontrado em frutas e ervas chinesas. Os efeitos biológicos desse flavonóide e de seus sulfatos/glicuronóides na produção de óxido nítrico e

citocinas por macrófagos estimulados por LPS foram investigados. Os seus efeitos protetores no choque séptico experimental também foram avaliados. Os resultados indicaram que 50% da produção de óxido nítrico foi inibida por 1,25mM de morina e 1,25µM de morina sulfato/glicuronídeos. Ocorreu também uma inibição de 30% na produção de TNF- $\alpha$  e 35% na produção de IL-12. Os autores concluíram que este flavonóide exibe atividade antiinflamatória e pode reduzir a incidência do choque séptico experimental através da diminuição das funções dos macrófagos. Pode ainda regular a resposta imune através da modulação do perfil de citocinas (FANG et al., 2003).

Pae et al. investigaram os efeitos do extrato metanólico da casca da *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae) na tentativa de validar o uso desta planta como um medicamento antiinflamatório na medicina tradicional coreana. Os autores observaram que o extrato inibiu a produção dos dois maiores mediadores inflamatórios derivados de macrófagos, NO e TNF- $\alpha$ , de maneira dose-dependente, sugerindo que o extrato pode ser útil no controle de doenças inflamatórias.

Com a intenção de procurar produtos naturais bioativos que exerçam atividade antiinflamatória Shin et al. (2004) avaliaram os efeitos do extrato metanólico das frutas *Kochia scoparia* (L.) CHARD. (Chenopodiaceae) na produção de NO, prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) e TNF- $\alpha$  por macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados por LPS. Os resultados obtidos indicam que o extrato é um potente inibidor da produção de NO. Uma diminuição significativa na liberação de PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$  também ocorreu. Os autores sugerem que o extrato inibiu a expressão das enzimas iNOS e COX-2 através do bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B.

Um conceito chave é o de que a inflamação dita normal é geralmente autolimitada, contudo a falta de regulação de algum de seus fatores leva a anormalidades e conseqüentemente a doenças (COUSSENS e WERB, 2002). Grandes quantidades de NO e TNF- $\alpha$  geradas por

macrófagos ativados induzem diversas condições fisiopatológicas durante a inflamação aguda e crônica (MANJEET e GHOSH, 1999). Dados recentes expandiram o conceito de que a inflamação é um componente crítico na progressão de tumores. Diversos tipos de câncer originam-se de sítios de infecção, irritação crônica ou inflamação, tornando-se claro que o microambiente tumoral, que é orquestrado pelas células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico (COUSSENS e WERB, 2002).

Várias substâncias fenólicas, particularmente aquelas presentes em plantas medicinais e comestíveis, possuem atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas. A maioria dos compostos fenólicos mantém propriedades antiinflamatórias e antioxidantes que parecem contribuir com as atividades de quimioprevenção. Uma vez que a inflamação está relacionada à promoção tumoral, espera-se que substâncias antiinflamatórias exerçam efeitos quimiopreventivos sobre a carcinogênese (SURH et al., 2001).

Efeitos biológicos já foram relatados com a *A. triplinervia* e a *A. glandulosa*. O extrato metanólico bruto e as frações hexano, clorofórmio, metanol/água e alcaloidal de *A. glandulosa* foram testados quanto às atividades antibacterianas, antifúngicas e antiproliferativas. O extrato metanólico, mostrou concentração mínima inibitória (CMI) de 250µg/mL em *S. aureus* e CMI de 125µg/mL em *C. albicans*. A fração clorofórmio teve CMI 250µg/mL em *C. albicans* e *C. tropicalis*. A fração metanol/água obteve CMI de 250µg/mL em *C. parapsilosis* e a fração alcaloidal apresentou CMI igual a 250µg/mL, em *S. aureus*, *E. coli*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*; CMI de 125µg/mL em *C. albicans*; CMI de 62,5µg/mL, em *B. subtilis* e CMI de 31,2µg/mL em *C. tropicalis*. Os valores de CMI de 250 e 125µg/mL foram considerados moderadamente ativos, os de 62,5 e 31,2µg/mL ativos, os de 15,6µg/mL mais ativos e os de 7,8µg/mL fortemente ativos. O extrato bruto produziu efeito citostático e citocida, concentração dependente, para as linhagens

de melanoma (UACC62), mama (MCF7) e pulmão (NCI460), com maior potência para a de melanoma. Já para a linhagem NCIADR (mama), que expressa o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, esse extrato produziu inibição de crescimento, ou seja, efeito citostático. Os resultados dos ensaios para as frações obtidas mostraram que o fracionamento do extrato bruto não produziu aumento da atividade (CONEGERO et al., 2003).

Taylor et al. (1998) analisaram mais de mil extratos de plantas coletadas aleatoriamente na Amazônia. Apenas cinco extratos foram capazes de alterar a formação de glicosaminoglicanas em células ovarianas de hamster, incluindo o extrato da *Alchornea triplinervia*. Os autores concluíram que plantas e outros produtos naturais podem ser uma fonte de agentes potencialmente benéficos para alterar a formação de glicosaminoglicanas e proteoglicanas em células animais.

Neste presente estudo sobre as ações das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* no sistema imunológico murino, foi observado que o fracionamento do extrato bruto não produziu aumento da atividade biológica, situação também encontrada por Conegero et al. em 2003 durante estudos da atividade antiproliferativa da *A. glandulosa*.

Todos os resultados obtidos neste trabalho, desde os testes de viabilidade até os testes de inibição, mostraram que a *A. triplinervia* e *A. glandulosa* possuem um padrão de resposta similar. Esse fato, talvez possa ser explicado, pelo perfil fitoquímico semelhante das duas espécies (item 4.1.).

Durante milhares de anos, a medicina popular chinesa considerou que certas ervas seriam úteis na estimulação ou supressão do sistema imunológico. Nas últimas duas décadas, pesquisadores deram grande atenção ao mecanismo de ação dessas ervas e no entendimento da imunomodulação. Além disso, existe também o interesse na pesquisa da prevenção do câncer e nos estudos sobre transplante de órgãos (HUANG, 1999).

A modulação da resposta imune por produtos derivados de plantas medicinais como uma possível medida terapêutica tem se tornado o assunto de investigações científicas recentes (MEHROTRA et al., 2003). A imunomodulação utilizando plantas pode proporcionar uma alternativa à terapia convencional, sendo necessária em uma variedade de doenças, especialmente quando os mecanismos de defesa do hospedeiro precisam ser ativados devido ao mau funcionamento do sistema imunológico, ou ainda quando um imunossupressor seletivo é necessário, como no caso das doenças auto-imunes (GANJU et al., 2003).

Os medicamentos derivados de plantas continuam a ser uma fonte valiosa de agentes terapêuticos no arsenal da medicina moderna (WIJESEKERA, 1991). Não se pode esquecer que a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco envolve investimentos muito altos, cujo custo de pesquisa varia entre 300 a 500 milhões de dólares, enquanto que o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido com custos muito menores (YUNES et al., 2001).

O TNF- $\alpha$  e o NO possuem importantes papéis na patogênese de várias doenças durante a inflamação aguda (NATHAN, 1992). A identificação de novos agentes farmacológicos que possam prevenir a superprodução de NO e/ou TNF- $\alpha$  é de considerável interesse médico (MANJEET e GHOSH, 1999).

A análise dos resultados encontrados em todos os experimentos aqui realizados indica que os extratos e frações da *A. triplinervia* e *A. glandulosa* são potentes inibidores da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO. Uma diminuição significativa na produção de TNF- $\alpha$  também ocorreu. Desse modo, essas plantas possuem um grande potencial imunomodulador, pois além de inibirem a produção de NO e TNF- $\alpha$ , ainda inibem a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estudos futuros, como por exemplo a avaliação da enzima iNOS e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, devem ser realizados na tentativa de elucidar melhor os mecanismos de ação através dos

quais os extratos e frações de *A. triplinervia* e *A. glandulosa* exercem atividade antiinflamatória. A inibição do NO e TNF- $\alpha$  foi concentração dependente, entretanto a inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não mostrou esse padrão. Logo, esses resultados sugerem que as plantas estão possivelmente atuando através de mecanismos diferentes. Eventualmente, também deveriam ser analisados os compostos isolados das plantas. Segundo Yunes e Calixto (2001) o extrato que apresentar efeito biológico mais pronunciado deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para isolamento e purificação dos compostos (YUNES e CALIXTO, 2001). Contudo, uma dúvida ainda permanece na pesquisa de substâncias naturais imunomodulatórias. Teriam os compostos puros derivados de plantas propriedades imunomodulatórias iguais ou similares as das preparações obtidas da planta inteira ou dos extratos brutos (WILLIAMS, 2001)?

No entanto, o sinergismo pode ser considerado uma vantagem dos fitoterápicos que atualmente justifica o seu uso. De maneira geral, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares. Pode ser mencionado, por exemplo, o efeito anti-malárico da artemisinina, composto presente na *Artemisia annua*, que atualmente é utilizada no combate ao *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*. Aparentemente, vários flavonóides desta planta apresentam algum efeito sinérgico sobre a malária quando associados a artemisinina. Pode ocorrer também uma associação de mecanismos de ação por atuação dos compostos em alvos moleculares diferentes. Por exemplo, o extrato de *Serenoa repens*, utilizado no tratamento da hiperplasia prostática benigna apresenta compostos que agem inibindo a atividade da 5 $\alpha$ -redutase (GOEPEL et al., 1999; YUNES et al., 2001).

Apesar de representarem um campo de estudos relativamente novo, os produtos naturais obtidos de plantas constituem uma rica e promissora fonte de novas moléculas com propriedades imunomodulatórias (WILLIAMS, 2001). Através da análise dos resultados obtidos, é possível

sugerir que os extratos metanólicos e as frações acetato de etila obtidos *A. triplinervia* e *A. glandulosa* podem apresentar atividade antiinflamatória. Os resultados encontrados já oferecem uma base racional para o uso tradicional dessas plantas.

---

## **VI – CONCLUSÃO**

Através dos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

- A citotoxicidade dos extratos metanólicos e das frações acetato de etila de *A. triplinervia* e *A. glandulosa*, em culturas de macrófagos peritoneais, é dependente da concentração.

- Os extratos metanólicos das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* não induziram liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e TNF- $\alpha$ .

- Os extratos e frações de ambas as plantas são potentes inibidores da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, enquanto que uma inibição parcial na produção de TNF- $\alpha$  foi observada.

- A inibição do NO e TNF- $\alpha$  foi concentração dependente, entretanto a inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não mostrou esse perfil.

- O fracionamento do extrato bruto não produziu aumento das atividades inibitórias.

- *A. triplinervia* e *A. glandulosa* apresentam um padrão de respostas similar no sistema imunológico murino. Fato que pode ser explicado pelo perfil fitoquímico semelhante das duas espécies.

- Tanto o extrato metanólico quanto a fração acetato de etila das plantas *A. triplinervia* e *A. glandulosa* podem apresentar atividade antiinflamatória.

---

## **VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABE, J.; BRADFORD, B.C. Fyn and JAK2 Mediate Ras Activation by Reactive Oxygen Species. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.274, n.30, p.21003-21010, 1999.

ACHIKE, F. I.; KWAN, C. Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Carlton, v.30, p.605-615, 2003.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.2, p.283-318, 1984.

AGARWAL, S. S.; SINGH, V. K. Immunomodulators: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides: Part I. Medicinal plants. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B.**, New Delhi, v. 65, p.179-204, 1999.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, Washington, v.221, n.4617, p.1256-1264, 1983.

AUTORE, G.; RASTRELLI, L.; LAURO, M. R.; MARZOCCO, S.; SORRENTINO, R.; SORRENTINO, U.; PINTO, A.; AQUINO, R. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. **Life Sci.**, Elmsford, v.70, p.523-534, 2001.

AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbia drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v.58, p.25–33, 2003.

BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.298, p.659-68, 1978.

BARILE, F. A. **Introduction to in vitro cytotoxicology**: mechanisms and methods. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. 222p.

BENDER, J. G.; MCPHAIL, L. C.; VAN EPPS, D.E. Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the respiratory burst enzyme. **J. Immunol.**, Baltimore, v.130, n.5, p.2316-2323, 1983.

BENENCIA, F.; COURREGES, M. C.; COULOMBIE, F. C. *Trichilia glabra*: effect on the phagocytic activity and respiratory burst response of peritoneal macrophages. **Immunopharmacol.**, New York, v.41, p.45-53, 1999.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y. C. E.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R. and CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, London, v.316, p.552-554, 1985.

BLUMBERG, P. M. In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v.8, n.2, p.153-197, 1980.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, New York, v.2, n.10, p.907-916, 2001.

BOGDAN, C. The Multiplex Function of Nitric Oxide in (Auto)immunity. **J. Exp. Med.**, New York, v.187, n.9, p.1361–1365, 1998.

BRACA, A; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; MORELLI, I. Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Biochem. Sistem. Ecol.**, Oxford, v.30, p.1109-1111, 2002.

BURGER, R. A.; TORRES, A. R.; WARREN, R. P.; CALDWELL, V. D.; HUGHES, B. G. Echinacea induced cytokine production by human macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v.19, p.371-379, 1997.

CALABRESE, V.; BOYD-KIMBALL, D.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. A. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. **In Vivo**, Athens, v.18, n.3, p. 245-67, 2004.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Cienc. Hoje**, São Paulo, v.21, n.123, 1996.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules. **Planta Med.**, Stuttgart, v.70, p. 93-103, 2004.

CANNELL, R. J. P. **Natural products isolation: methods in biotechnology** vol.4. Totowa: Humana Press. 1998. 473p.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais e potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640p.

CASALE, T. B.; COSTA, J. J.; GALLI, S. J. TNF- $\alpha$  is important in human lung allergic reactions. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, New York, v.15, n.1, p. 35-44, 1996.

CHIHARA G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. **Dev. Biol. Stand.**, Basel, v.77, p.191-197, 1992.

CIRINO, G.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G. The nitric oxide related therapeutic phenomenon: a challenging task. **Curr. Pharm. Des.**, San Francisco, v.8, n.3, p.233-239, 2002.

CLEMENT, M., PONTON, A.; PERVAIZ, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.440, p.13-18, 1998.

COHEN, P. S.; NAKSHATRI, H.; DENNIS, J.; CARAGINE, T.; BIANCHI, M.; CERAMI, A.; TRACEY, K. CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.93, n.9, p.3967-71, 1996.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M.H.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Quim. Nova**, São Paulo, v.26, n.6, p.825-827, 2003.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London , v.420, p.860-867, 2002.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.11, n.1, p.1-16, 1984.

DINARELLO, C.A.; GELFAND, J.A.; WOLFF, S.M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. **Jama**, Chicago, v.269, n.14, p.1829-35, 1993.

DINERMAN, J. L.; LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Molecular mechanisms of nitric oxide production. Potential relevance to cardiovascular disease. **Circ. Res.**, Baltimore, v.73, p.217-222, 1993.

DIRSCH, V. M.; KIEMER, A. K.; WAGNER, H.; VOLLMAR, A. M. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. **Atherosclerosis**, Limerick, v.139, p.333-339, 1998.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995. 230p.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, London, v.411, p.843-847, 2001.

DRAPIER, J. C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. B. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.18, p.1587-1592, 1988.

DRATH, D. B., KARNOUSKY, M. L. Superoxide production by phagocytic leukocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.141, p.257-261, 1975.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P. A., PERERA, P.; BOHLIN, L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.57, p.35-56, 1997.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Nitric oxide revision. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

DUSTING, G. J.; MacDONALD, P. S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med.**, Helsinki, v.27, n.3, p.395-406, 1995.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, Cambridge, v.18, n.10, p.487-492, 1997.

ELIZABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.51, p.110-120, 1996.

ELIZABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.38, n.2-3, p.137-143, 1993.

ESPÉCIES ARBÓREAS e Arbustivas da Mata Ciliar. FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA “ANDRÉ TOSELLO”. **Base de Dados Tropical**. 2003. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/species>>. Acesso em: 14 jun. 2004.

FANG, S. H.; HOU, Y. C.; CHANG, W. C.; HSIU, S. L.; CHAO, P. D. L.; CHIANG, B. L. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. **Life Sciences**, Elmsford, v.74, p.743-756, 2003.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o Profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 743p.

FITOMEDICAMENTOS: Respeito à Natureza e Amor ao Brasil. **Sobrafito**. 2004.

Disponível em: <http://www.sobrafito.com.br/artigo3.html>. Acesso em 01 abr. 2004.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, São Paulo, v.46, n.3, p.265-271, 2000.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v.166, p.S4–S8, 2002.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, Elmsford, v.22, p.189-216, 2001.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

GANJU, L.; KARAN, D.; CHANDA, S; SRIVASTAVA, K. K; SAWHNEY, R. C.; SELVAMURTHY, W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v.57, p.296–300, 2003.

GIBSON, P. R. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? **Gut**, London, v.53, n.12, p.1724-1725, 2004.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v.22, n.1, p.26-30, 2000.

GOEL, V.; CHANG, C.; SLAMA, J. V.; BARTON, R.; BAUER, R.; GAHLER, R.; BASU, T. K. Alkylamides of Echinacea purpurea stimulate alveolar macrophage function in normal rats. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.2, p.381-387, 2002.

GOEPEL, M.; HECKER, U.; KREGE, S.; RUBBEN, H.; MICHEL, M. C. Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha1-adrenoceptors in vitro. **Prostate**, New York, v.38, n.3, p.208-215, 1999.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J. OSBORNE, B. A. W.H. **Kuby immunology**. New York: W. H. Freeman and company, 4.ed. 2000. 670p.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. R. Shamanism or science? **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.74, n.1, p.135-144, 2002.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FRANSWORTH, N. R. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.73, p.347-377, 2000.

GREEN, L .C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.**, New York, v.126, n.1 p.131-138, 1982.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **Faseb J.**, Bethesda, v.1, n.5, p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.486, p.10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, London, v.219, p.1-14, 1984.

HAMBURGER; M.; HOSTETTMANN K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochem.**, New York , v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HAMID, Q.; SPRINGALL, D. R.; RIVEROS-MORENO, V.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J. M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. **Lancet**, London, v.342, n.8886-8887, p.1510-1513, 1993.

HIBBS, J. B. Jr.; WESTENFELDER, C.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; KABLITZ, C.; BARANOWSKI, J. H.; WARD, R. L.; MENLOVE, R. L.; McMURRY, M. P.; KUSHNER, J. P.; SAMLOWSKI, W. Evidence for cytokine - inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. **J. Clin. Invest.**, New York, v.89, p.867-877, 1992.

HISTORY OF BOTANICAL concepts. **Department of Botany**. 2003. Disponível em:

[http://www.botany.utoronto.ca/courses/BOT307/F\\_Organization/307notes09.html#Dioscorides](http://www.botany.utoronto.ca/courses/BOT307/F_Organization/307notes09.html#Dioscorides).

Acesso em: 17 mai. 2004.

HOBBS, A. J.; HIGGS A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.39, p.191-220, 1999.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HOLMES-McNARY, M.; BALDWIN JR, A. S. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase. **Cancer Res.**, Baltimore, v.60, n.13, p.3477-3483, 2000.

HOOPER, D. C.; BAGASRA, O.; MARINI, J. C.; ZBOREK, A.; OHNISHI, S. T.; KEAN, R.; CHAMPION, J. M.; SARKER, A. B.; BOBROSKI, L.; FARBER, J. L.; AKAIKE, T.; MAEDA, H.; KOPROWSKI, H. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: Implications for the treatment of multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.94, p.2528-2533, 1997.

HU, C.; ZAWISTOWSKI, J.; LING, W.; KITTS, D. D. Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) Pigmented Fraction Suppresses both Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Chemical and Biological Model Systems. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.51, p.5271-5277, 2003.

HUANG, K. C. The pharmacology of Chinese Herbs. Boca Raton: CRC Press, 1999.512p.

IALENTI, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.110, n.2, p.701-706, 1993.

IMUNOHEMATOLOGIA: células do sistema imune, 2002. Disponível em:

<http://ioh.medstudents.com.br/imuno2.htm>. Acesso em: 28 set. 2004.

IMMUNOMODULATION. Webref.org, 2004.

Disponível em: <http://www.webref.org/cancer/i/immunomodulation.htm> Acesso em: 21 jun. 2004.

ISCHIROPOULOS, H.; NELSON, J.; DURAN, D.; AL-MEDHDI, A. Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interfere with the determination of hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.20, p.373-381, 1996.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.;CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o Sistema Imunológico na Saúde e na Doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.

JUN, C. D.; CHOI, B. M.; RYU, H.; UM, J. Y.; KWAK, H. J.; LEE, B. S.; PAIK, S. G.; KIM, H. M.; CHUNG, H. T. Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN- $\gamma$  for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v.153, p.3684-3690, 1994.

KARKABOUNAS, S.; ASSIMAKOPOULOS, D.; MALAMAS, M.; SKALTSOUNIS, A. L.; LEONCE, S. et al. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of a aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210 malignant cell line and tumor bearing Wistar rats. **Anticancer Res.**, Athens, v.20, p.4391– 4395, 2000.

KAUL, N.; FORMAN, H.J. Activation of NF $\kappa$ B by the respiratory burst of macrophages. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.21, n.3, p.401-405, 1996.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.100, n.5, p. 567-573, 1993.

KILBOUM, R. G.; GRIFFITH, O. W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.84, n.11, p.827-831, 1992.

KIM, H. M.; MOON, Y. H. Human chorionic gonadotropin induces nitric oxide synthase mRNA in mouse peritoneal macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.229, p.548-552, 1996.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Boca Raton, v.44, n.2, p.143-161, 2002.

KOBUCHI, H.; DROY-LEFAIX, M. T.; CHRISTEN, Y.; PACKER, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761):inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.53, p.897-903, 1997.

KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacol. Sin.**, Beijing, v.24, n.1, p.7-21, 2003.

KORTING, H. C.; SCHINDLER, S.; HARTINGER, A.; KERSCHER, M.; ANGERPOINTNER, T.; MAIBACH, H. I. MTT-assay and neutral red release (NRR)-assay: relative role in the prediction of the irritancy potential of surfactants. **Life Sci.**, Elmsford, v.55, p.533-540, 1994.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 221, n.3, p.220-235, 1995.

LANGHANS, W. Bacterial products and the control of ingestive behavior: clinical implications. **Nutrition**, New York, v.12, n.5, p.303-315, 1996.

LAWSON, L. D.; BAUER, R. **Phytochemicals of Europe: chemistry and biological activity**. Washington: American Chemical Society, 1998. 324p.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X. C.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radic. Biol. Med.**, New York , v.30, p.1234-1242, 2001.

LEUTTIG, B.; STEINMULLER, C.; GIFFORD, G. E.; WAGNER, H.; LOHMANN-MATTHES, M. L. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.81, n.9, p.669-675, 1989.

LISTA de Árvores Nativas do Brasil. CEPEN. **Centro de Pesquisas Eco-naturais**. Disponível em: [http://www.cepen.com.br/arvore\\_nat\\_list.htm#A%20Lista](http://www.cepen.com.br/arvore_nat_list.htm#A%20Lista) Acesso em: 14 jun. 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas e árvores nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LU, Y.; ZHAO, W. Z.; CHANG, Z.; CHEN, W. X.; LI, L. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. **Acta Pharmacol. Sin.**, Beijing, v.25, n.8, p.1083-1089, 2004.

MacMICKING, J.; QIAO-WEN XIE; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function

**Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.15, p.323–350,1997.

MANGA, H. M.; BRKIC, D.; MARIE, D. E. P.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.92, p.209-214, 2004.

MANJEET, K. R.; GHOSH, B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v.21, p.435-443, 1999.

MANNICK, E. E.; BRAVO, L. E.; ZARAMA, G.; REALPE, J. L.; ZHANG, X. J.; RUIZ, B.; FONTHAM, E. T.; MERA, R.; MILLER, M. J.; CORREA, P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effects of antibiotics and antioxidants.

**Cancer Res.**, Baltimore, v.56, n. 14, p. 3238-3243, 1996.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, Durham, v.5, n.3, p.185-198, 2000.

MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; MONTANARI, A.; ASH, K.; MANTHEY, C.L. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytes. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.62, n.3, p.441-444, 1999.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, Cambridge, v.78, n.6, p. 927-930, 1994.

MARLETTA, M.A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, Easton, v.27, n.24, 8706-8711, 1988.

MATSUDA, H.; KAGEURA, T.; TOGUCHIDA, I.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; YOSHIKAWA, M. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-b 23-acetate and -c 23-acetate. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, New York, v.9, p.3081-3086, 1999.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: EUFC, 1997.141 p.

MEDICAL DICTIONARY. Fast health: interactive healthcare. 2004.

Disponível em: <http://www.fasthealth.com/dictionary/i/immunomodulation.php> Acesso em :24 jun. 2004.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; SINGH, V. K. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.2, p.987-996, 2002.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; YADAV, V. S.; PANDEY, R.; SINGH, V. K. Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.3, p.53–61, 2003.

METHE, H.; ZIMMER, E.; GRIMM, C.; NABAUER, M.; KOGLIN, J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.78, n.9, p.1324-1331, 2004.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.52, p.673–751, 2000.

MIJATOVIC, T.; VERONIQUE K, DANIEL C, PATRICK D, GEORGES H. IL-4 and IL-13 inhibit TNF- $\alpha$  mRNA translation activation in LPS induced mouse macrophages. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.272, n.22, p.14394-14398, 1997.

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, Helsinki, v.27, n.3, p.359-67, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MORIKAWA, T.; TAO, J.; ANDO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Absolute stereostructures of new arborinane-type triterpenoids and inhibitors of nitric oxide production from *Rubia yunnanensis*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.66, p.638-645, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J.**, Bethesda, v.6, n.12, p.3051-3064, 1992.

NATURAL HEALTH School.com. **A Brief History of Herbalism**. Lesson 2. 2004. Disponível em: <http://www.naturalhealthschool.com/history-of-herbalism.html>. Acesso em 5 out. 2004

NATURALEZA EDUCATIVA. **Plantas medicinales**. Herboristería y farmacología. 1ª parte. 2004. Disponível em: [http://www.iespana.es/natureduca/med\\_hist\\_herborist1.htm](http://www.iespana.es/natureduca/med_hist_herborist1.htm). Acesso em 5 out. 2004

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; LAPA E SILVA, J. R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J. R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J. L. Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J. Exp. Med.**, New York, v.183, n.5, p.2293-2302, 1996.

OGUNGBAMILA, F. O.; SAMUELSSON G. Smooth muscle-relaxing flavonoids from *Alchornea cordifolia*. **Acta Pharm. Nord.**, Stockholm, v.2, n.6, p.421-422, 1990.

OH, H.; PAE, H. O.; OH, G. S.; LEE, S. Y.; CHAI, K. Y.; SONG, C. E.; KWON, T. O.; CHUNG, H. T.; LEE, H. S. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis from catalposide from *Catalpa ovata*. **Planta Med.**, Stuttgart v.68, p.685-689, 2002.

OLATUNDE FAROMBI, E.; OGUNDIPE, O. O.; SAMUEL UHUNWANGHO, E.; ADEYANJU, M. A.; OLARENWAJU MOODY, J. Antioxidant properties of extracts from *Alchornea laxiflora* (Benth) Pax and Hoffman. **Phytother. Res.**, London, v.17, n.7, p.713-716, 2003.

OPOKU, A. R.; GEHEEB-KELLER, M.; LIN J.; TERBLANCHE, S. E.; HUTCHINGS, A. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for antineoplastic activities versus the HepG2 cell line. **Phytother. Res.**, London, v.14, p.534– 537, 2000.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FALTYNEK, C. R. Cytokines. In: STITES, D. P.; STOBO, J. D.; WELLS, J. V. **Basic clinical immunology**. 8. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. cap.9, p.105-123.

OSADEBE, P.O.; OKOYE, F.B.C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.89, p.19-24, 2003.

PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI B. M.; SHIN, S.; CHAI, K. Y.; OH, H.; KIM, J. M.; KIM, H. J.; JANG, S. I.; CHUNG, H. T. Inhibitory effects of the stem bark of *Catalpa ovata* G. Don. (Bignoniaceae) on the productions of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide by the lipopolisaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.88, p.287-291, 2003.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v.2, p.736-746, 2003.

PAN, M. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I $\kappa$ b kinase and NF $\kappa$ B activation in macrophages. **Biochem.Pharmacol.**, New York, v. 60, p. 1665-1676, 2000.

PARHAM, P. **O sistema immune**. Porto Alegre: Artmed . 2001. 372p.

PARSLOW, T. G.; BAINTON, D. F. Imunidade Inata. In: STITES, D. P; TERR, A. I.; PARNSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. cap.2, p.19-32.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Med.**, Stuttgart, v.69, p.491-495, 2003.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.38, p.161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.46, p.211-226, 1981.

PLANTAS MEDICINAIS. **A Antiguidade e seus médicos**. 2004. Disponível em: [http://www.ciagri.usp.br/planmedi/a\\_medicos.html](http://www.ciagri.usp.br/planmedi/a_medicos.html). Acesso em 10 jul. 2004

PUNZÓN, C.; ALCAIDE, A.; FRESNO, M. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.3, p.1293-1299, 2003.

RAMASARMA, T. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, New Delhi, v.27, n.5, p.269-274, 1990.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, Elmsford, v. 39, p.603–613, 2001.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5.ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

ROITT, I. M.; DELVES, P. T. Roitt's essential immunology. 9 ed. London: Blackwell Science, 1997. 476p.

ROSE, M. L.; RUSYN, I.; BOJES, H. K.; BELYEA, J.; CATTLEY, R.C.; THURMAN, R.G. Role of Kupffer cells and oxidants in signaling peroxisome proliferator-induced hepatocyte proliferation. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.448, n.2, p.179-92, 2000.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M. F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MIYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthrides. **J. Clin. Invest.**, New York, v.96, n.5, p.2357-2363, 1995.

SANDOVAL, M.; CHARBONNET, R. M.; OKUHAMA, N. N.; ROBERTS, J.; KRENOVA, Z.; TRENTACOSTI, A. M.; MILLER, M. J. Cat's claw inhibits TNF-alpha production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.29, n.1, p.71-78, 2000.

SANTOS, A. L.; RIPOLL, D.; NARDI, N.; BASSANI, V. L. Immunomodulatory effect of *Achyrocline satureioides* (LAM.) D.C. aqueous extracts. **Phytother. Res.**, London, v.13, n.1, p.65-66, 1999.

SCHACHNA, L. The anti-TNF revolution in ankylosing spondylitis. **Med. J. Aust.**, Sydney, v.181, n.10, p.529-530, 2004.

SCHINDLER, H.; BOGDAN, C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.1, p.1443-1455, 2001.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional**: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. Barueri: Manole, 2002. 386p.

SEIDL, P. R. Prospects for Brazilian Natural Products. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.71, p. 239-247, 1999.

SEO, W. G.; PAE, H. O.; OH, G. S.; CHAI, K. Y.; YUN, Y. G.; KWON, T. O.; CHUNG, H. T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. **Gen. Pharmacol.**, Oxford, v.35, p.21-28, 2001.

SETZER, W. N.; SHEN, X.; BATES, R. B.; BURNS, J. R.; MCCLURE, K. J.; ZHANG, P.; MORIARITY, D.M.; LAWTON, R.O. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, Milano, v.71, n.2, p.195-198, 2000.

SHIN, J. Y.; SONG, J. Y.; YUN, Y. S.; YANG, H. O.; RHEE, D. K.; PYO, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* macrophage function. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, New York, v. 24, n. 3, p. 469-482, 2002.

SHIN, K. M.; KIM, Y. H.; PARK, W. S.; KANG, I.; HA, J.; CHOI, J. W.; PARK, H. J.; LEE, K. T. Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin e2, and tumor necrosis factor- $\alpha$  production from murine macrophage raw 264.7 cells. **Biol. Pharm. Bull**, Tokyo, v. 27, n. 4, p. 538-543, 2004.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.61, p.1053-1071, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. 833 p.

SOLIMAN, K. F.; MAZZIO, E. A. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v.218, n.4, p.390-397, 1998.

SUMNER, J. **The Natural History of Medicinal Plants**. Portland: Timber Press. 2000. 235p.

SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H.H.; HAN, S. S.; KEUM, Y. S.; PARK, K. K.; LEE, S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. **Mutat. Res.**, Amsterdam,, v.480-481, p.243-268, 2001.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A regeneração de uma floresta tropical montana após corte e queima (São Paulo - Brasil). **Rev. Bras. Biol.**, São Carlos, v.59, n.2 , p. 239-251, 1999.

TAYLOR, L. **Herbal Secrets of the Rainforest**. 2.ed. Rocklin: Prima Publishing, 1998, 360p.

TAYLOR, W. H.; SINHA, A.; KHAN, I. A.; MCDANIEL S. T., ESKO, J. D. Primers of Glycosaminoglycan Biosynthesis from Peruvian Rain Forest Plants. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.273, n.35, p.22260-22266, 1998.

TEZUKA, Y.; IRIKAWA, S.; KANEKO, T.; BANSKOTA, A. H.; NAGAOKA, T.; XIONG, Q.; HASE, K.; KADOTA, S. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.77, p. 209–217, 2001.

TOUWAIDE, A. The integration of Greek pharmacology into Arabic world. **Med Secoli.**, Rome, v.7, n.1, p.159-189, 1995.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annu. Rev. Med.**, Palo Alto, v.45, p.491-503, 1994.

TROTTER, R. T.; LOGAN, M. H.; ROCHA, J. M.; BONETA, J. L. Ethnography and bioassay: combined method for a preliminary screen of home remedies for potential pharmacological activity. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.8, p.113-119, 1982.

TSAI, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.126, n.3, p.673-680, 1999.

TYLER, V. E. Herbal medicine: from the past to the future. **Public Health Nutr.**, Wallingford , v. 3, n.4A, p. 447-452, 2000.

URREA-BULLA, A.; SUAREZ M. M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, Milano, v.75, p.392–394, 2004.

VODOVOTZ, Y.; LUCIA, M. S.; FLANDERS, K. C.; CHESLER, L.; XIE, Q. W.; SMITH, T. W.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; WEBBER, R.; NATHAN, C.; ROBERTS, A. B.; LIPPA, C. F.; SPORN, M. B. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. **J. Exp. Med.**, New York, v.184, n.4, p.1425-1433, 1996.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer, 1986. 675 p.

WANG, C. C; HUANG, Y. J.; CHEN, L. G.; LEE, L. T.; YANG, L. L. Inducible nitric oxide synthase inhibitors of chinese herbs III. *Rheum palmatum*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.68, p.869-874, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Good manufacturing practices: specific pharmaceutical products. 2004. Disponível em:

[http://www.who.int/medicines/organization/qsm/activities/qualityassurance/gmp/gmpthree\\_herb.html](http://www.who.int/medicines/organization/qsm/activities/qualityassurance/gmp/gmpthree_herb.html). Acesso em: ago. 2004.

WIJESEKERA, R. O. B. **The medicinal plant industry**. Boca Raton: CRC Press,1991. 269p.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, Saindpoint, v.6, n.6, p. 567-579, 2001.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, São Paulo, v. 43, p. 50-51, 1998.

YAMAGUCHI, H. Immunomodulation by medicinal plants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 319, p.287– 297, 1992.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 24, n.1, p.147-152, 2001.

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. **Macrophage-pathogen interactions**. New York: Marcel Dekker, 1994. 634p.

---

## **VIII – APÊNDICE**

### Preparo de soluções, reagentes e meios de cultura

#### - Meio RPMI-1640

Dissolver o conteúdo de um frasco em 1000mL de água milli-Q. Acrescentar:

HEPES.....2,38g

bicarbonato de sódio.....2g

Ajustar o pH em 7,0-7,2. Em seguida, completar o volume para 1000mL e esterilizar utilizando membrana de 0,22µm. Após esterilização, aliquotar o meio em frascos de 100mL. Estocar sob refrigeração a 4°C.

No momento do uso, adicionar ao meio penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100U/mL), glutamina (2mM), mercaptoetanol (50 mM) e 5% de soro fetal bovino.

#### - Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

##### Solução 1

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.....27,4 g

água milli-Q q.s.p.....386mL

##### Solução 2

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O.....7,88 g

água milli-Q q.s.p.....114mL

*Solução estoque:* preparar, inicialmente, as soluções 1 e 2. Em seguida, misturar as duas soluções e completar o volume para 1000mL com água milli-Q e autoclavar. O pH deve ser de 7.2. Armazenar sob refrigeração (4°C)

*Solução de uso:* o modo de preparo está descrito a seguir.

---

Solução estoque.....	40mL
NaCl.....	8,5g
água milli-Q q.s.p.....	1000mL

Ajustar o pH, se necessário, e autoclavar. Armazenar sob refrigeração (4°C).

#### - Tampão fosfato de potássio

Fosfato dissódico anidro.....	11,46g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	21,57g
Fosfato monopotássico.....	2,65g
Água destilada qsp.....	1000mL

Acertar o pH em 7,2.

#### - Reagente de Griess

Sulfanilamida.....	1,0g
Naftiletilenodiamina.....	0,1g
Ácido orto-fosfórico.....	2,5mL
Água milli-Q q.s.p.....	100 mL

Dissolver a sulfanilamida e a naftiletilenodiamina. Acrescentar, aos poucos, o ácido fosfórico. Completar o volume para 100mL. Manter o reagente sob refrigeração (4°C). Proteger da luz.

#### - Peroxidase

Pesar 1mg de peroxidase e adicionar em 1mL de tampão fosfato. Aliquotar e armazenar a -20°C.

**- Líquido de Lázarus**

Violeta de genciana 1%.....2mL

Ácido acético glacial.....3mL

Água destilada qsp.....100mL

**- Tioglicolato 3 %**

Colocar 3g do meio em 100mL de água destilada. Distribuir em tubos e autoclavar.

**- Solução de PMA**

Dissolver 1mg de PMA em 1,3mL de DMSO sob ambiente de nitrogênio líquido, a fim de evitar a oxidação. A concentração da solução é de  $1 \times 10^{-3}$ M. Aliquotar em *ependorfs* com parafilme. Conservar em dessecador no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Preparar solução diluída no momento do uso.

**- Solução de LPS**

Dissolver 1mg de LPS em 1 mL de meio RPMI, esterilizar por filtração utilizando membrana de  $0,22\mu\text{m}$  e armazenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente diluir para a concentração de  $1\mu\text{g/mL}$ , utilizando RPMI-1640.

**- Solução de MTT- tetrazólio**

Preparar solução estoque de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5

difeniltetrazólio) a 5 mg/mL em PBS. Esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22µm. Guardar sob refrigeração a 4°C e protegida da luz. No momento do uso, diluir a solução estoque em RPMI sem soro fetal para a concentração de 1mg/mL.

#### **- Teste imunoenzimático ELISA de captura**

As soluções preparadas para a realização do ELISA estão descritas a seguir.

##### PBS\*

NaCl.....	80g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	11,6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,0g
KCl.....	2,0g
Água milli-Q q.s.p .....	10L

Acertar o pH em 7.0

##### Diluyente de ensaio

PBS\* com 10% de soro fetal bovino.

##### Tampão de lavagem

PBS\* com 0,05% de Tween 20