



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-*Leishmania amazonensis*,
ANTI-*Trypanosoma cruzi* E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS
DE PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO**

JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA

**Salvador - Bahia - Brasil
2004**



001640

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

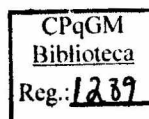
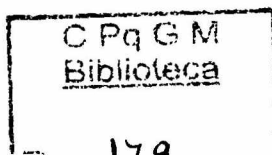
**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-*Leishmania*
amazonensis, ANTI-*Trypanosoma cruzi* E IMUNOMODULADORA
EM EXTRATOS DE PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO**

JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA

Professor-orientador: MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ, para a obtenção do grau de mestre em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia, 2004



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Costa, José Fernando Oliveira
C8337i Investigação de Atividades Anti-*Leishmania amazonensis*, Anti-*Trypanosoma cruzi* e Imunomoduladora em Extratos de Plantas do Semi-Árido Brasileiro [manuscrito] / por José Fernando Oliveira Costa. - 2004.
79 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.
Orientadora: Prof. Dra. Milena Botelho Pereira Soares, Laboratório de Imunofarmacologia.

1. Farmacologia. I. Título.

CDU 615

615

615

C8337i

MFN1302
001640

INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-*LEISHMANIA AMAZONENSIS*, ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* E IMUNOMODULADORA EM EXTRATOS DE PLANTAS DO SEMI-ARIDO BRASILEIRO


JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

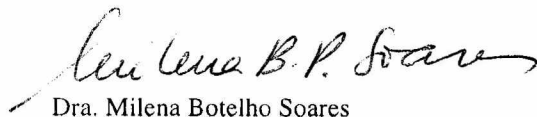
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Maria Barbosa Filho
Professor Titular
UFPB



Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Milena Botelho Soares
Pesquisadora Adjunta
CPqGM - FIOCRUZ

“Falar é completamente fácil, quando se têm palavras em mente que expressam sua opinião. Difícil é expressar por gestos e atitudes o que realmente queremos dizer, o quanto queremos dizer, depois que a pessoa se vai”.

Carlos Drummond de Andrade

Ao meu pai (*in memoriam*) e à minha mãe, exemplos de dignidade, compreensão e abnegação; pessoas sem as quais a minha vida não seria completa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. Pela generosidade em colocar ao meu lado sempre pessoas tão especiais, que a mim têm propiciado de forma muito agradável, a experiência do viver plenamente.

Aos Doutores Ricardo Ribeiro dos Santos e Milena B. P. Soares, exemplos de dedicação à ciência, ao trabalho. Pela orientação, oportunidade, confiança e incentivo nesse meu início de trajetória pelos caminhos da ciência.

À Doutora Mara Zélia de Almeida, orientadora de iniciação científica, grande mestra e amiga, pessoa que a mim abriu as portas da ciência, que ensinou-me com o seu próprio exemplo de vida que tudo pode ser mais simples, a depender do ângulo em que se olha.

À Doutora Juceni David, grande profissional, co-orientadora de monitoria da disciplina Farmacognosia (UFBA) e também de iniciação científica, pessoa com quem experimentei a satisfação do estar em sala de aula, do ensinar.

A Minha Mãe e às minhas irmãs, três grandes mulheres na minha vida, pessoas que mesmo distante fisicamente estão ao meu lado sempre, em qualquer circunstância.

A Alexandre Avancini, Carla Wanderley, Daniele Brustolim e Rodrigo Andrade, meus amigos, pessoas sublimes, presentes sempre em minha vida; seres que tornam essa minha existência mais tranqüila e feliz. A Bruna Freitas, Maurício Carvalho, Paulo Mascarenhas, Luciana Ramos, Daniel Macedo e Ana Emília Andrade, grandes pessoas, amigos de muita importância.

Aos amigos Edlene Santos e Ademir do Vale pelos agradáveis momentos de convivência em laboratório e pelas conversas inteligentes. A Matheus Sá e Fábio Galdino, pelo companheirismo e presença em diversos momentos do desenvolvimento desse trabalho.

À minha família, em especial às pessoas que sempre me apoiaram, que acreditaram no meu potencial. A Diana Sampaio e a João Paulo Schoucair, seres exemplos de determinação e lealdade.

A Ricardo Lima e Elisalva Guimarães, pelo companheirismo, por terem dividido comigo tanto os momentos difíceis como os agradáveis do curso de pós-graduação.

Aos colegas do LETI/CPqGM/FIOCRUZ pelos momentos agradáveis e pelo que cada um a mim ensina, com os seus próprios exemplos.

A Rosália Silva e a Iumara Evangelista, pela dedicação e presteza com que trabalham.

A todas as pessoas que na minha vida tiveram o papel de mestre, que contribuíram com o meu processo de aprendizagem.

À CAPES e à FIOCRUZ pela bolsa de pós-graduação.

Ao CPqGM/FIOCRUZ, pela excelente estrutura e facilidades ao desenvolvimento das atividades.

Investigação científica não termina com seus dados, ela inicia-se com eles.
O produto final da ciência é uma teoria ou hipótese de trabalho e não os assim chamados
fatos.

George H. Mead, 1965

Resumo

INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-*Leishmania amazonensis*, ANTI-*Trypanosoma cruzi* E IMUNOMODULADORA EM EXTRATOS DE PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO. JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA. A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial depende da medicina tradicional, onde cerca de 25.000 espécies de plantas são usadas nas preparações de extratos vegetais. No semi-árido brasileiro, que inclui oito estados e corresponde a 11,5% do território nacional, estima-se haver 8 mil espécies vegetais pouco estudadas quanto às atividades farmacológicas. Diante dessa vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novas moléculas bioativas, é de fundamental importância o estudo farmacológico da flora dessa região, tendo em vista a acelerada degradação ambiental que põe em risco de extinção um grande número de espécies. Este trabalho teve como objetivo a investigação da atividade anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora em extratos de plantas nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro. O material vegetal utilizado neste estudo foi coletado e identificado por uma equipe de botânicos integrantes do Instituto do Milênio do Semi-Árido (IMSEAR/MCT). Os extratos foram obtidos a partir de 69 espécies vegetais e com solventes de diferentes polaridades químicas. Para os ensaios de atividade farmacológica, testaram-se inicialmente os extratos para a determinação de concentrações tóxicas para células de camundongos (esplenócitos), sendo utilizadas nos ensaios subsequentes aquelas com até 30% de citotoxicidade. Para os ensaios de atividade antiparasitária *in vitro*, os parasitas foram cultivados em presença dos extratos e o percentual de inibição foi medido através da determinação do metabolismo do MTT. Os ensaios de inibição da linfoproliferação foram realizados cultivando as células na presença do mitógeno concanavalina A e dos extratos. A proliferação foi determinada através da medida da incorporação de timidina tritiada. Para a avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO), cultivou-se macrófagos peritoneais de camundongo na presença de IFN- γ e LPS e dos extratos. A produção de NO foi avaliada pela dosagem de nitrito, através do método de Griess. Dos 174 extratos avaliados, 3 apresentaram atividade anti-leishmania acima de 90% e 10 apresentaram atividade anti-*T. cruzi* superior a 60%. Em relação à atividade imunomoduladora, 47 extratos apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação superior a 80%, enquanto que 16 dos 174 extratos testados apresentaram atividade de inibição da produção de NO acima de 70%. Frações obtidas a partir de 2 extratos de vegetais com atividade imunomoduladora foram reavaliadas, identificando-se as ativas. Os extratos e frações avaliados apresentam um potencial farmacológico importante, sobretudo em relação à atividade imunomoduladora. Outros extratos ativos serão fracionados e estas, assim como as frações já obtidas serão re-fracionadas para reavaliação com o intuito identificar as moléculas responsáveis pela atividade, podendo ser no futuro candidatas a novos fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: atividade anti-*L. amazonensis*, atividade anti-*T. cruzi*, atividade imunomoduladora, plantas do semi-árido brasileiro.

Abstract

INVESTIGATION OF ANTI-*Leishmania amazonensis*, ANTI-*Trypanosoma cruzi* AND IMMUNO-MODULATORY ACTIVITIES IN PLANT EXTRACTS OF THE BRAZILIAN SEMI-ARID. JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA.

[INTRODUCTION] The World Health Organization estimates that 80% of the world's population depends on conventional medicine, in which around 25.000 plant species are used in the preparation of extracts. In the Brazilian semi-arid, which includes eight states and corresponds to 11,5% of the national territory, it is estimated that there are 8 thousand plant species scarcely studied regarding its pharmacological activities. Considering this vast biodiversity and the need for the discovery of new bioactive molecules, the pharmacological study of this regions' flora is of fundamental importance, given the accelerated environmental degradation that puts in risk of extinction a great number of species. In this work we aimed at the investigation of anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* and immuno-modulatory activities of extracts of native or endemic plants from the Brazilian semi-arid. The vegetal material used in this study was collected and identified by a team of botanists who were part of the Institute of the Millennium of the Semi-Arid (MCT). The extracts were obtained from 69 plant species with solvents of different chemical polarities. For the assays of the pharmacological activity, the extracts were initially tested to determine the toxic concentrations for mammal cells (mouse splenocytes), being used in subsequent assays those with up to 30% cytotoxicity. For the assays of antiparasitic activities *in vitro*, the parasites were cultivated in the presence of the extracts and the percentage of inhibition was measured through the determination of the metabolism of the MTT. The lymphoproliferation inhibition assays were carried out by cultivating the cells in the presence of the mitogen concanavalin A and of the extracts. The proliferation was determined through the measurement of ³H-thymidine incorporation. For the evaluation of the inhibition of nitric oxide (NO) production, mouse peritoneal macrophages were cultivated in the presence of IFN- γ and LPS and the extracts. The production of NO was evaluated by the dosage of nitrite, through the Griess method. Of the 174 extracts evaluated, 3 showed anti-leishmania activity above 90% and 10 showed anti-*T. cruzi* activity superior to 60%. Regarding the immunomodulatory activity, 47 extracts showed inhibitory activity of lymphoproliferation superior to 80%, whereas 16 out of 174 extracts tested showed 70% of inhibitory activity on NO production. Fractions obtained from 2 extracts with immunomodulatory activity were tested afterwards to identify the active ones. The extracts and fractions evaluated showed an important pharmacological potential, especially in relation to the immunomodulatory activity. Other active extracts will be fractioned and these, as well as the already obtained fractions will be re-fractioned for re-evaluation, with the purpose of identifying the molecules responsible for the activity, putative candidates to new pharmaceutical drugs.

[KEY-WORDS] Anti-*L. amazonensis* activity, anti-*T. cruzi* activity, immunomodulatory activity, plants from the Brazilian semi-arid.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

1. Introdução.....	14
1.1 A importância dos produtos naturais.....	14
1.2 Biodiversidade vegetal no Brasil.....	15
1.3 O mercado mundial e o desenvolvimento de fitofármacos.....	16
1.4 Doenças negligenciadas.....	18
1.5 As imunopatologias.....	22
1.6 A vegetação do semi-árido brasileiro.....	24
2 Objetivos.....	26
3 Justificativa.....	27
4 Material e Métodos.....	28
4.1 Considerações éticas.....	28
4.2 Coleta dos vegetais e obtenção dos extratos e frações.....	28
4.3 Animais.....	32
4.4 Avaliação da citotoxicidade.....	32
4.5 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i>	33
4.6 Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.7 Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico.....	34
4.8 Avaliação da inibição da linfoproliferação.....	35
5 Resultados.....	37
5.1 Avaliação da atividade anti- <i>L. amazonensis</i> de extratos de plantas do semi-árido brasileiro.....	37

5.2 Avaliação da atividade anti-<i>Trypanosoma cruzi</i> de extratos de plantas do semi-árido brasileiro.....	39
5.3 Avaliação da atividade inibidora da produção de óxido nítrico.....	41
5.4 Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação.....	43
5.5 Avaliação da atividade de frações da espécie <i>Passiflora cincinnata</i>.....	45
5.6 Avaliação da atividade de frações da espécie <i>Nymphaea ampla</i>.....	48
6 Discussão.....	58
7 Conclusões.....	69
8 Referências bibliográficas.....	70

Lista de Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate).

Con A – Concanavalina A (Concanavalin A).

DMEM – Meio Eagle de modificado de Dulbeco (Dulbeco's Modified Eagle Medium).

DMSO - Dimetil sulfóxido (Dimethyl sulphoxide).

IFN- γ – Interferon- γ (Interferon- γ).

IL- Interleucina (Interleukin).

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (inducible nitric oxide sintase).

LIT – (Liver infusion tryptose).

LPS – Lipopolissacarídeo (lipopolysaccharide).

MTT – 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2yl)-2,5-brometo difenil-tetrazolio ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

NEED – N-(1-naftil) etil-enediamina ((N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine).

NO – Óxido nítrico (Nitric oxide).

OMS – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization).

P & D – Pesquisa & Desenvolvimento (Research & Development).

SBF – Soro Bovino Fetal (Fetal calf serum).

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (Tumor necrosis factor- α).

Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição das espécies avaliadas por famílias.....	31
Figura 2 – Avaliação da atividade anti-<i>L. amazonensis</i> de extratos de plantas do semi-árido brasileiro.....	38
Figura 3 – Avaliação da atividade anti-<i>Trypanosoma cruzi</i> de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro.....	40
Figura 4 – Avaliação de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro quanto à atividade inibidora da produção de óxido nítrico.....	42
Figura 5 – Avaliação de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro quanto à atividade inibidora da proliferação de linfócitos ativados.....	44
Figura 6 – Avaliação de frações do extrato de <i>Passiflora cincinnata</i> quanto à atividade inibidora da produção de óxido nítrico.....	46
Figura 7 – Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação de frações de extratos da espécie <i>Passiflora cincinnata</i>.....	47
Figura 8 – Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação de frações do extrato de <i>Nymphaea ampla</i>.....	49

Lista de tabelas

Tabela 1: Identificações botânicas, partes do vegetal utilizadas e tipo do extrato analisado.....	50
Tabela 2: Resultados dos ensaios de imunomodulação e atividade antiparasitária dos extratos testados.....	54
Tabela 3: Apresentação dos resultados obtidos com as espécies estudadas neste trabalho e informações disponíveis na literatura acerca de atividade biológica para espécies da família.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância dos produtos naturais

O valor dos produtos naturais, especialmente das plantas medicinais, para a sociedade e para a economia mundial é muito significativo. Estima-se que 60 a 80% da população, sobretudo de países em desenvolvimento, ainda confia no poder terapêutico de plantas medicinais e delas utiliza-se para o tratamento de suas doenças (OMS-<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>). Cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são originadas de plantas, o que perfaz um total de 121 substâncias ativas. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente originadas de plantas e grande parte são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos. Apesar do aumento dos estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das espécies vegetais do planeta foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SIMÕES *et al.*, 2001). Nesse contexto, as pesquisas com propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas têm reassumido um importante papel nos últimos anos. Exemplos de drogas importantes obtidas a partir de plantas são a digoxina da *Digitalis* spp., a quinina e a quinidina da *Cinchona* spp., a vincristina e a vinblastina da *Catharanthus roseus*, a atropina da *Atropa belladonna* e a morfina e a codeína da *Papaver somniferum*. (SIMÕES *et al.*, 2001).

Afirma-se que o mercado mundial de fitoterápicos movimenta anualmente cerca de US\$ 20 bilhões, sendo US\$ 1,5 bilhões só no Brasil (PINTO *et al.*, 2002; FUNBIO, 2004). Cerca de 30% dos medicamentos desenvolvidos nos países de primeiro mundo são

provenientes de recursos naturais e têm menores custos quando comparados aos obtidos por síntese, uma vez que aqueles obtidos de plantas usadas na medicina popular já têm propriedades conhecidas e muitos deles já são usados na forma de medicamentos fitoterápicos (CALIXTO, 1996).

1.2 Biodiversidade vegetal no Brasil

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta. Possui entre 15 e 20% do número total de espécies existentes, sendo estimado um valor de 270 mil espécies, com número superior a 55 mil espécies já descritas (SANT'ANA, 2002; MMA, 2000). De acordo com Farnsworth (1989), existem no Brasil cerca de 150 mil espécies de vegetais superiores.

A composição total da diversidade brasileira não é conhecida e talvez nunca venha a ser, tal a sua proporção e complexidade. Entretanto, para a maioria dos seres vivos, o percentual de ocorrência em território nacional é elevado, podendo-se deduzir que o número de espécies, tanto terrestres como marinhas, ainda não identificadas no Brasil pode alcançar valores da ordem de dezenas de milhões (SANT'ANA, 2002).

Aliado ao fator da biodiversidade brasileira, deve-se considerar que as espécies vegetais que ocorrem em áreas de clima tropical contêm de três a quatro vezes mais constituintes químicos ativos quando comparadas a espécies que ocorrem em áreas de clima temperado (DI STASI *et al.*, 2002). O diverso patrimônio genético brasileiro tem hoje um inestimável valor econômico em várias atividades, sendo no campo do desenvolvimento de novos medicamentos a sua maior potencialidade, considerando o grande número de

medicamentos disponíveis no mercado obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

1.3 O mercado mundial e o desenvolvimento de fitofármacos

Um em cada quatro produtos vendidos nas farmácias é fabricado a partir de materiais extraídos de plantas das florestas tropicais ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais. Somente nos Estados Unidos, em 1980, foram vendidos formalmente cerca de US\$ 8 bilhões em medicamentos derivados de plantas (SANT'ANA, 2002). Durante os anos de 1959 a 1980, os medicamentos derivados de vegetais representaram 25% de todas as prescrições médicas dispensadas nas farmácias dos Estados Unidos (SANT'ANA, 2002).

A indústria farmacêutica global representa 33% da produção de químicos, o que equivale a um faturamento anual da ordem de US\$ 280 bilhões (SANT'ANA, 2002). A distribuição por origem de medicamentos mostra que 65% são preparados em laboratórios, sendo 25% a partir de plantas e 10% a partir de animais e microrganismos (SANT'ANA, 2002). Se considerado o mercado para drogas anticancerígenas e antibióticos, este percentual é ainda mais elevado: cerca de 70% foram desenvolvidas a partir de recursos naturais (SANT'ANA, 2002).

A indústria farmacêutica utiliza aproximadamente 90 espécies de vegetais em suas atividades de produção de medicamentos (RATES, 2001). Dezesete das grandes indústrias farmacêuticas mundiais têm programas de pesquisa na área de produtos naturais. Esta indústria é altamente dependente dos gastos do setor público com saúde (nos Estados Unidos, 14% dos gastos totais), sendo que parte significativa dos recursos advindos do setor público é aplicado em pesquisa e desenvolvimento (P&D) (SANT'ANA, 2002). A

indústria farmacêutica sempre esteve baseada em inovação e diferenciação de produtos, com grandes investimentos em P&D. Na década de 1960, as despesas globais em P&D de fármacos foram calculadas em cerca de US\$ 50 milhões, chegando rapidamente a valores da ordem de US\$ 400 milhões (SANT'ANA, 2002).

O interesse crescente do setor privado no desenvolvimento de novos fármacos oriundos de vegetais está associado ao seu baixo custo, quando comparado com o da descoberta de um medicamento sintético. Enquanto o custo de desenvolvimento de um fármaco de origem sintética pode chegar a US\$ 360 milhões e levar entre 7 e 20 anos até que o produto final chegue ao mercado, no desenvolvimento de um produto proveniente de plantas medicinais este investimento é da ordem de aproximadamente US\$ 70 milhões (SANT'ANA, 2002).

A compreensão de que a biotecnologia não está ainda em condições de concorrer com a natureza na formulação de moléculas com atividade terapêutica levou as indústrias farmacêuticas a retomarem o método de triagem em busca de substâncias naturais como ponto de partida para o desenho de novas drogas. A combinação do método de triagem e de síntese facilita a descoberta de novas moléculas ativas (SANT'ANA, 2002).

Ao se considerar os métodos de obtenção de novos fármacos, deve-se ainda levar em conta dois aspectos que distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular, bastante superior àquela dos produtos obtidos por síntese, e a funcionalidade, aumentada quando se trata de moléculas obtidas de organismos vivos.

No caso de países em desenvolvimento, como o Brasil, que ainda não dispõem de estímulo para a implementação da tecnologia em química fina farmacêutica, as pesquisas com produtos naturais assumem um papel importante, uma vez que a probabilidade de se

encontrar novas moléculas farmacologicamente ativas é maior através do estudo de plantas do que por síntese química (LAPA, 1995).

1.4 Doenças negligenciadas

Estima-se que menos de 10% dos gastos globais em pesquisa em saúde são direcionados para doenças que representam cerca de 90% dos problemas de saúde globais (MOREL, 2003). Esta deficiência do mercado tem contribuído para a limitada disponibilidade de drogas para o tratamento das doenças que acometem principalmente indivíduos de países em desenvolvimento. O setor privado investe quase que exclusivamente no desenvolvimento de drogas voltadas para o tratamento de patologias comuns em países desenvolvidos (MOREL, 2003).

Dentre as doenças mais negligenciadas está a doença de Chagas, uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A maior parte dos casos de infecção dos seres humanos ocorre através do contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos (triatomíneos) contaminados por *T. cruzi*. Este protozoário infecta quase 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, como também seres humanos (TDR/WHO, 2003 - <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>).

A doença de Chagas está presente em 18 países do continente americano, em duas zonas ecologicamente diferentes: a região do cone sul, onde os vetores do protozoário e humanos convivem no mesmo ambiente peridomiciliar e a América Central e o México, onde os vetores estão presentes tanto em regiões povoadas quanto em áreas inabitadas (TDR/WHO, 2003 - <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>). As condições precárias de habitação favorecem a disseminação da doença, sobretudo em áreas rurais.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2003), a prevalência da doença de Chagas é de 13 milhões de casos (TDR/WHO-<http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>). A incidência anual é de 200 mil casos, em quinze países latino-americanos. No Brasil, os dados disponíveis (1995) indicam a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em 4,2% da população rural e 1,3% do total da população do país (BRENER *et al.*, 2000). Por ser uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante, o custo econômico é elevado, e, como a população acometida é habitualmente de baixo nível sócio-econômico, os gastos são cobertos pelo Estado.

Atualmente, há uma droga existente no mercado para tratamento específico, o benzonidazol, um derivado do nitroimidazol (Rochagan®, Roche). Outra substância utilizada até recentemente é o nifurtimox, um nitrofurano (Lampit® / Bayer 2502®, Bayer). Ambas são eficazes somente na forma aguda ou crônica recente da doença, e ainda podem induzir efeitos colaterais tóxicos ao paciente (URBINA *et al.*, 2003). Assim, é de extrema relevância a busca de novas substâncias para o tratamento da doença de Chagas, que apresentem maior eficácia no tratamento de pacientes na fase crônica e menor toxicidade.

Entre as estratégias utilizadas na busca de novas drogas eficazes contra o *T. cruzi*, está a triagem de moléculas que atuam em alvos importantes da biologia do parasito. Dentre estes alvos moleculares mais utilizados estão as enzimas diidrofolato redutase (ZUCCOTTO, 2001), tripanotiona redutase (CHAN *et al.*, 2002) e cruzipaina (CAZZULO, 2002; 2001). Inibidores da biossíntese de esteróides (URBINA, 2002) e análogos mono e dissustituídos da poliamina (BACCHI & YARLETT, 2002), componentes biológicos essenciais à viabilidade e sobrevivência do protozoário, também são moléculas com potencial atividade anti-*T. cruzi*.

Outro grande problema de saúde pública são as leishmanioses, doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2004), estima-se que este conjunto de doenças afete mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em 88 países, sendo que, destes, 72 são considerados como países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos (TDR/WHO - <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>). A incidência anual da forma cutânea da doença é de 1 a 1,5 milhão de pessoas e da forma visceral é de 500 mil casos. A população sob o risco de contrair a doença em todo o mundo é de 350 milhões de pessoas (OMS, 2003-<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>). No Brasil, durante os anos de 1984 e 1999, 37.294 novos casos de leishmaniose visceral humana foram notificados pelo Ministério da Saúde (PALATNIK-DE-SOUZA *et al.*, 2001) e somente no período compreendido entre 1998 e 2000, 87.350 novos casos foram registrados (TDR/WHO, 2002-<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>). Recentemente, o aumento elevado na taxa de co-infecção em pacientes HIV positivos (ALVAR *et al.*, 1997) e o desenvolvimento de resistência dos parasitos às drogas existentes têm aumentado a importância desta doença na saúde pública (LEANDRO & CAMPINO, 2003).

O tratamento das leishmanioses tem sido feito com a utilização de metais pesados, em particular os compostos antimoniais, como drogas de primeira escolha. Quando este tipo de terapia não é efetivo, outros medicamentos são usados, dentre estes a pentamidina e a anfotericina B lipossomais, medicamentos de administração injetável para os quais o paciente necessita de supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento devido à gravidade dos possíveis efeitos colaterais (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001). Dessa forma, a busca de novas substâncias, efetivas e seguras, para o tratamento das leishmanioses torna-se prioritária.

Uma das principais linhas de investigação de novos tratamentos para leishmaniose é a de desenvolvimento de fármacos capazes de bloquear alvos do sistema biológico do parasito vitais à sobrevivência do mesmo, como por exemplo, os mecanismos que levam à síntese de ATP, cujos níveis definem o estado energético do parasito. A fosforilação oxidativa é um processo essencial para preencher um nível energético mínimo necessário à sobrevivência do parasito. Dessa forma, drogas que afetam a produção mitocondrial de ATP, tais como as licochalconas e naftoquinonas, são boas candidatas a drogas leishmanicidas. Moléculas com este mecanismo de ação diminuem os níveis de ATP intracelulares do parasito, uma vez que a glicólise é um processo ineficaz para contrabalancear o decréscimo de ATP (LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2001).

Espécies vegetais podem servir como fonte de substâncias com atividade anti-protozoário. Da classe dos taninos, isolados de espécies vegetais, demonstrou-se algumas substâncias com atividade anti-*Leishmania*, com ação sobre formas amastigotas da espécie *L. donovani* (KIDERLEN *et al.*, 2001). Extratos de vegetais ricos em substâncias polifenólicas inibiram o crescimento de formas amastigotas e promastigotas de parasitos da espécie *L. amazonensis* (MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2004). O óleo essencial da espécie *Croton cajucara*, rico em linalol, demonstrou-se ativo, inibindo o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (DO SOCORRO *et al.*, 2003). Extratos de espécies pertencentes à família Rutaceae apresentaram atividade contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (MAFEZOLI *et al.*, 2000). A chalepina, substância isolada da espécie vegetal *Pilocarpus spicatus*, demonstrou atividade anti-*T. cruzi* (PAVAO *et al.*, 2002). Dessa forma, diversas substâncias têm sido identificadas e suas atividades demonstradas contra os protozoários do gênero *Leishmania* e da espécie *Trypanosoma cruzi*.

1.5 As imunopatologias

As doenças mediadas pelo sistema imune são um problema de saúde global, estão em crescimento em proporções epidêmicas (KRENSKY *et al*, 2001) e demandam rapidez na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. Estas doenças incluem um amplo espectro de patologias, dentre elas a artrite reumatóide, a diabetes mellitus tipo I, o lúpus eritematoso sistêmico, a esclerose múltipla, a asma e várias outras condições alérgicas. A incidência das imunopatologias tende a aumentar com o envelhecimento da população, tendo em vista o aumento da expectativa de vida do ser humano (ROEP, 2003).

O transplante de órgãos é uma das grandes possibilidades terapêuticas para o tratamento de diversas patologias. No entanto, a rejeição de transplantes, mediada pelo sistema imune, permanece como um fator que dificulta a utilização desta tecnologia, sendo necessário o tratamento contínuo com drogas imunossupressoras. É de grande relevância, portanto, a descoberta de novas drogas imunomoduladoras, tendo em vista a sua aplicabilidade em processos imunopatológicos.

Drogas com ação moduladora da ativação de macrófagos e linfócitos, como os corticosteróides, têm sido amplamente utilizadas para o controle de respostas imuno-inflamatórias indesejadas (KRENSKY *et al*, 2001). Os corticóides e a ciclosporina são exemplos de drogas imunossupressoras eficazes disponíveis atualmente no mercado, que causam vários efeitos colaterais no paciente. No caso dos corticóides, alguns dos efeitos colaterais observados são o retardo no crescimento, necrose avascular de medula, osteopenia, úlcera péptica, aumento do risco de contrair infecções, aparecimento de catarata, hiperglicemia e hipertensão. A ciclosporina apresenta como efeitos colaterais o aparecimento de tremores, hipertensão, hiperlipidemia e também nefrotoxicidade, sendo

este último efeito presente na maioria dos pacientes tratados com a droga (BURDMANN *et al.*, 2003; KRENSKY *et al.*, 2001).

Os corticóides têm seu mecanismo de ação imunomodulador baseado na diminuição do número de linfócitos no sangue periférico, na regulação da transcrição de diversos genes e na indução de apoptose, sendo este último efeito através do aumento da concentração do $\text{I}\kappa\text{B}$, reduzindo a ativação do $\text{NF}\kappa\text{B}$, que resulta no aumento da apoptose das células ativadas. É de importância central na ação dos esteróides a diminuição da produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IL-6, diminuindo conseqüentemente a ação de macrófagos e linfócitos (KRENSKY *et al.*, 2001). A ciclosporina, droga inibidora da calcineurina, tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da transdução de sinal desencadeada pela ativação do receptor de linfócitos T, reduzindo a produção de linfocinas, incluindo a IL-2, como também a expressão de proteínas antiapoptóticas. O tacrolimus também inibe a ativação de células T através da inibição da calcineurina (KRENSKY *et al.*, 2001).

A ativação de macrófagos leva à produção de vários mediadores imunológicos solúveis, tais como citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e radicais livres de oxigênio e de nitrogênio. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, produzido por uma família de enzimas, incluindo a óxido nítrico sintase constitutiva e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em processos inflamatórios (ASLAN, 2002; BOGDAN, 2001; KAUFMANN & KABELITZ, 1998; COTRAN *et al.*, 2000). Sendo assim, substâncias capazes de inibir a ativação de macrófagos têm potencial utilização como imunomoduladores.

Espécies vegetais podem ser uma fonte de substâncias com atividade imunomoduladora. Recentemente foi demonstrado que substâncias químicas extraídas da espécie vegetal *Crotalaria pallida* inibem a produção de NO *in vitro* de forma concentração

dependente (WENG *et al.*, 2003). Outros exemplos de moléculas com atividade imunomoduladora são as fisalinas, seco-esteróides purificados da espécie *Physalis angulata* e que apresentam potente atividade inibidora da produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (SOARES *et al.*, 2003) e a espécie *Dendrobium nobile* da qual isolou-se um sesquiterpeno com atividade inibidora da proliferação de linfócitos (ZHAO *et al.*, 2001).

1.6 A vegetação do semi-árido brasileiro

O semi-árido brasileiro é uma região que possui uma vegetação típica, denominada caatinga, que cobre a maior parte da área com clima semi-árido da região Nordeste do Brasil. A região do semi-árido abrange uma área aproximada de 800.000 km², incluindo partes dos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (GIULIETTI *et al.*, 2002; <http://www.asabrazil.org.br/Semiarido/semiarido.htm>). Outros tipos vegetacionais ocorrem no semi-árido brasileiro além da caatinga, como o cerrado, campos rupestres e diferentes tipos de florestas.

Dos biomas brasileiros, a caatinga é provavelmente o mais desvalorizado e pouco conhecido. Esta situação decorre de uma propaganda não justificada, e não mais aceita, de que a caatinga é o resultado da modificação de outra formação vegetal, associada a uma diversidade muito baixa de plantas, ausência de espécies endêmicas e altamente antropizada. Apesar da última consideração ser real, especialmente nas terras de menor altitude, há uma grande variedade de espécies na caatinga, sendo muitos táxons raros e/ou endêmicos (GIULIETTI *et al.*, 2002) e estima-se que nesta região existam cerca de oito mil espécies vegetais (INSTITUTOS DO MILÊNIO/MCT, 2002).

Trabalhos já publicados chamam a atenção para a riqueza da flora da caatinga, destacando exemplos fascinantes de adaptações das plantas aos habitats semi-áridos. Existe descrita uma lista de vegetais angiospermas endêmicos da caatinga, na qual estão relacionados 12 gêneros e 183 espécies (GIULIETTI *et al.*, 2002). Desta forma, espera-se encontrar, neste tipo de vegetação, uma grande diversidade de metabólitos especiais e potenciais moléculas bioativas.

2 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a atividade anti-parasitária e imunomoduladora *in vitro* de extratos e frações de plantas nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro.

Específicos

- Investigar a atividade imunomoduladora *in vitro* de extratos e frações de vegetais do semi-árido brasileiro através de ensaio de inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ e de ensaio de inibição da proliferação de linfócitos ativados.
- Avaliar a atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* de extratos e frações de vegetais do semi-árido brasileiro nas formas epimastigotas.
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania amazonensis* *in vitro* (formas promastigotas) de extratos e frações de plantas do semi-árido brasileiro.

3 JUSTIFICATIVA

É grande a necessidade do investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) voltados para o combate de doenças comuns em países em desenvolvimento, as chamadas doenças negligenciadas, como as leishmanioses e a doença de Chagas. Como exemplo da carência em P&D para as doenças negligenciadas, medicamentos para o tratamento das doenças tropicais foram responsáveis por somente 0,5% de todas as patentes farmacêuticas em todo o mundo entre os anos de 1975 e 1995 (MRAZEK & MOSSIALOS, 2003). Das 1223 drogas licenciadas no mundo entre os anos de 1975 e 1996, menos de 1% de todas as inovações terapêuticas (11 novas moléculas e duas reformulações de moléculas já conhecidas) foram para doenças tropicais (MRAZEK & MOSSIALOS, 2003). A descoberta de novas moléculas bioativas para o tratamento das imunopatologias é também de extrema importância, considerando que as drogas atualmente disponíveis no mercado, além de apresentarem alto custo de tratamento, possuem uma vasta gama de efeitos colaterais indesejáveis, que acabam por comprometer a qualidade de vida do paciente.

Em referência ao semi-árido brasileiro, conforme mencionado na Introdução, estima-se existir cerca de oito mil espécies vegetais (INSTITUTOS DO MILÊNIO/MCT, 2002), ainda pouco estudadas do ponto de vista farmacológico. Considerando ainda a elevada taxa de degradação ambiental nesta região, torna-se urgente o estudo da flora do semi-árido quanto à atividade farmacológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqGM/FIOCRUZ). As coletas dos vegetais foram realizadas em Áreas de Proteção Ambiental (APAs) do Estado da Bahia, sendo as mesmas autorizadas pelo Centro de Recursos Ambientais do Estado da Bahia (CRA/BA).

4.2 Coleta dos vegetais e obtenção dos extratos e frações

As espécies vegetais endêmicas ou nativas do semi-árido brasileiro foram coletadas pela equipe de botânicos das diversas instituições integrantes do Instituto do Milênio do Semi-Árido/MCT, coordenado pela Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Giulietti (UEFS). O material vegetal foi previamente desidratado e, após secagem, recebeu identificação botânica. Exsiccatas das espécies foram confeccionadas e depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). Sessenta e nove espécies vegetais pertencentes a 34 famílias botânicas foram estudadas. A distribuição das espécies estudadas por famílias encontra-se ilustrada na Figura 1.

Parte do material vegetal seco foi enviada ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, da Faculdade de Farmácia da UFBA, coordenado pela Prof^ª. Dr^ª. Juceni P. de L. David, ao Laboratório de Estudo Fitoquímico de Plantas Medicinais ou Endêmicas do Instituto de Química da UFBA, coordenado pelo Prof. Dr. Jorge Maurício David e ao Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais da UFAL, coordenado pela

Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Maria Conserva, responsáveis pelo preparo dos extratos vegetais e fracionamento dos mesmos.

Com o intuito de eliminar a umidade absorvida, o material foi submetido a uma nova desidratação por um período de 24 horas à temperatura de 40° C, em estufa aerada. Cem gramas do material seco foram moídas em moinho (Willey, Tecnal) e maceradas em metanol por duas vezes consecutivas. O extrato metanólico obtido foi concentrado através de evaporação em evaporador rotatório. Em seguida, adicionou-se água na proporção de 7:3 metanol/água. O extrato hidroalcoólico foi particionado inicialmente com hexano para a obtenção do extrato hexânico e posteriormente foi feita uma extração com clorofórmio, obtendo-se o extrato clorofórmico. O metanol do extrato hidroalcoólico resultante foi evaporado e a solução aquosa obtida foi particionada utilizando-se acetato de etila, obtendo-se desta maneira o extrato acetato de etila. Os extratos foram encaminhados ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (LETI/CPqGM/FIOCRUZ), para realização dos ensaios de atividade biológica. A lista dos extratos testados encontra-se na Tabela 1.

Dois extratos que apresentaram atividade elevada nos ensaios realizados foram fracionados com o objetivo de se identificar frações que continham o princípio ativo. Para o fracionamento dos extratos, utilizou-se a técnica de cromatografia em coluna. Nesta, a sílica foi utilizada como fase sólida e o solvente utilizado teve a sua polaridade alterada progressivamente. As frações foram coletadas, secas e encaminhadas ao LETI/CPqGM/FIOCRUZ para a realização dos ensaios.

Para este trabalho foram testados 200 extratos e frações extraídas de 69 espécies vegetais. Os extratos e frações foram inicialmente dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e suas concentrações foram ajustadas

para 10 mg/mL. Os extratos e frações dissolvidos foram esterilizados com a utilização de radiação gama (60.000 rad), e estocados a - 20° C. Do total de extratos analisados, 52% foram preparados a partir de folhas dos vegetais, 28% foram preparados a partir de caule das respectivas espécies e 20% a partir de partes aéreas.

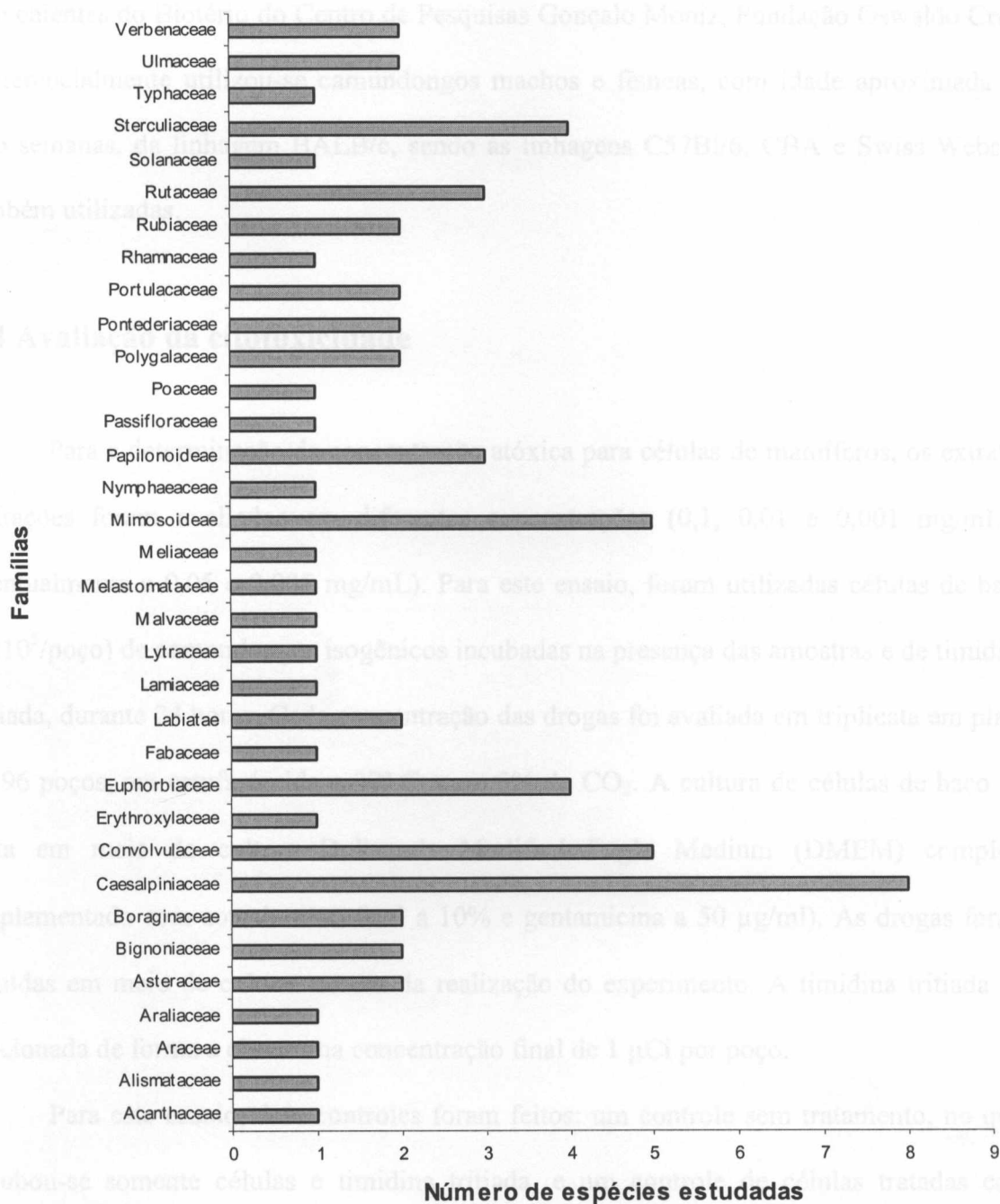


Figura 1: Distribuição das espécies avaliadas por famílias.

4.3 Animais

Os camundongos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Preferencialmente utilizou-se camundongos machos e fêmeas, com idade aproximada de oito semanas, da linhagem BALB/c, sendo as linhagens C57Bl/6, CBA e Swiss Webster também utilizadas.

4.4 Avaliação da citotoxicidade

Para a determinação da concentração atóxica para células de mamíferos, os extratos e frações foram avaliados em diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL e eventualmente a 0,05 e 0,005 mg/mL). Para este ensaio, foram utilizadas células de baço (6×10^5 /poço) de camundongos isogênicos incubadas na presença das amostras e de timidina tritiada, durante 24 horas. Cada concentração das drogas foi avaliada em triplicata em placa de 96 poços, em estufa úmida a 37° C, com 5% de CO₂. A cultura de células de baço foi feita em meio de cultura Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo (suplementado com soro bovino fetal a 10% e gentamicina a 50 µg/ml). As drogas foram diluídas em meio de cultura no dia da realização do experimento. A timidina tritiada foi adicionada de forma a obter uma concentração final de 1 µCi por poço.

Para este ensaio, dois controles foram feitos: um controle sem tratamento, no qual incubou-se somente células e timidina tritiada, e um controle de células tratadas com saponina (concentração final de 0,05%), substância com reconhecida atividade citotóxica. Após o período de incubação, as células foram coletadas em um filtro de fibra de vidro,

utilizando-se um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA). Os filtros foram secos à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, lidos em contador de radiação beta (Beta Counter, Packard, Meriden, CT, EUA). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se os valores de radiação incorporados pelas células incubadas na presença dos extratos com os valores do controle não tratado. A concentração dos extratos e frações utilizada para os ensaios posteriores foi a mais elevada que apresentasse uma toxicidade de até 30%.

4.5 Avaliação da atividade anti-*Leishmania amazonensis*

Para este ensaio foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura axênica em meio LIT completo enriquecido com soro bovino fetal a 10% e gentamicina a uma concentração final de 50 µg/ml. Os parasitos foram incubados na presença dos extratos ou frações vegetais em placa de 96 poços. Foram plaqueados 5×10^6 parasitos/poço em volume final de 200 µl, sendo cada substância avaliada em triplicata.

Dois controles foram preparados: um controle sem tratamento, consistindo da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e um controle de leishmanias tratadas com uma droga com atividade leishmanicida conhecida, a anfotericina B a 25 µg/ml. Os parasitos foram incubados na presença das drogas durante 24 horas a 26° C. Após esse período, adicionou-se o MTT (3-(4,5-Dimetil-tiazol-2yl)-2,5-brometo difenil-tetrazolio) e incubou-se novamente a 26° C durante 2 horas, após as quais foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade dos parasitos foi avaliada

com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor de absorbância obtido. Os percentuais de atividade anti-*L. amazonensis* foram definidos comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

4.6 Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

Formas epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de cultura axênica em meio de cultura LIT completo. Os parasitos foram plaqueados em placas de 96 poços a 10^7 parasitos/poço, em um volume final de 200 μ l. Foram realizados controles sem tratamento, consistindo da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e com tratamento com uma droga com atividade anti-*T. cruzi* conhecida, a anfotericina B a 25 μ g/ml. Os parasitos foram incubados durante 24 horas a 26° C em presença dos extratos ou frações testados. Após esse período, adicionou-se o MTT e incubou-se novamente a 37° C durante 3 horas, uma vez que o metabolismo desse sal pelos parasitos demonstrou-se mais intenso nesta temperatura. A leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). Os percentuais de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

4.7 Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos e frações de vegetais quanto à inibição da produção de óxido nítrico, utilizou-se macrófagos do exsudato peritoneal de

camundongos injetados, por via intraperitoneal, com tioglicolato a 3% em salina. A lavagem peritoneal, com meio de cultura DMEM suplementado com 50 µg/ml de gentamicina, foi feita após um período de 4-5 dias de injeção do tioglicolato. As células do exsudato peritoneal foram incubadas em placas de cultura de 96 poços (2×10^5 células/poço) por um período de 2 horas, em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂. Após este período, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes. As células aderentes foram estimuladas com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (5 ng/ml), na presença ou não dos extratos ou frações, em meio DMEM completo. Após 24 horas, 50 µl do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para a avaliação da quantidade de nitrito através do método de Griess (DING *et al*, 1988).

A reação de Griess foi feita adicionando-se aos 50 µl do sobrenadante/poço igual volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloreto naftiletileno diamina - NEED - 0,1% em H₃PO₄ a 0,3 M). A leitura das placas foi feita imediatamente em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico de cada extrato ou fração avaliado foi determinada comparando-se os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes de culturas de células não tratadas com drogas.

4.8 Avaliação da inibição da linfoproliferação

Para avaliar a atividade inibidora da linfoproliferação dos extratos e frações de vegetais, foram utilizadas células totais de baço de camundongos. As células (4×10^5 /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio DMEM completo, na presença ou não dos extratos ou frações e estimuladas com o mitógeno concanavalina A (Con A; 1 µg/ml;

Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), lectina de origem vegetal (*Canavalia ensiformis*) capaz de provocar ativação policlonal de linfócitos. Cada substância foi testada em triplicata.

As células foram incubadas durante 48 horas em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂. Após este período, adicionou-se timidina tritiada (1 μ Ci/poço) e incubou-se novamente as células em estufa sob as mesmas condições, por um período de 12-18 horas. As células foram então coletadas para quantificação da radioatividade beta, conforme descrito anteriormente. A medida da inibição da proliferação celular foi determinada através da comparação da incorporação da timidina em culturas de células estimuladas com Con A somente ou em presença dos extratos e frações.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade anti-*L. amazonensis* de extratos de plantas do semi-árido brasileiro

As atividades anti-*L. amazonensis* de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro foram agrupadas em faixas de percentuais de atividade, conforme pode ser observado na Figura 2. Dos 174 extratos avaliados, 3 apresentaram valores iguais ou superiores a 90%, sendo estes obtidos de espécies pertencentes às famílias Portulacaceae (*Portulaca hirsutissima* e *Portulaca werdermannii*) e Lytracae (*Cuphea sp*) (Tabelas 1 e 2). Os 171 extratos restantes apresentaram atividade inferior a 34% (Figura 2 e Tabelas).

Atividade anti-*Leishmania amazonensis*

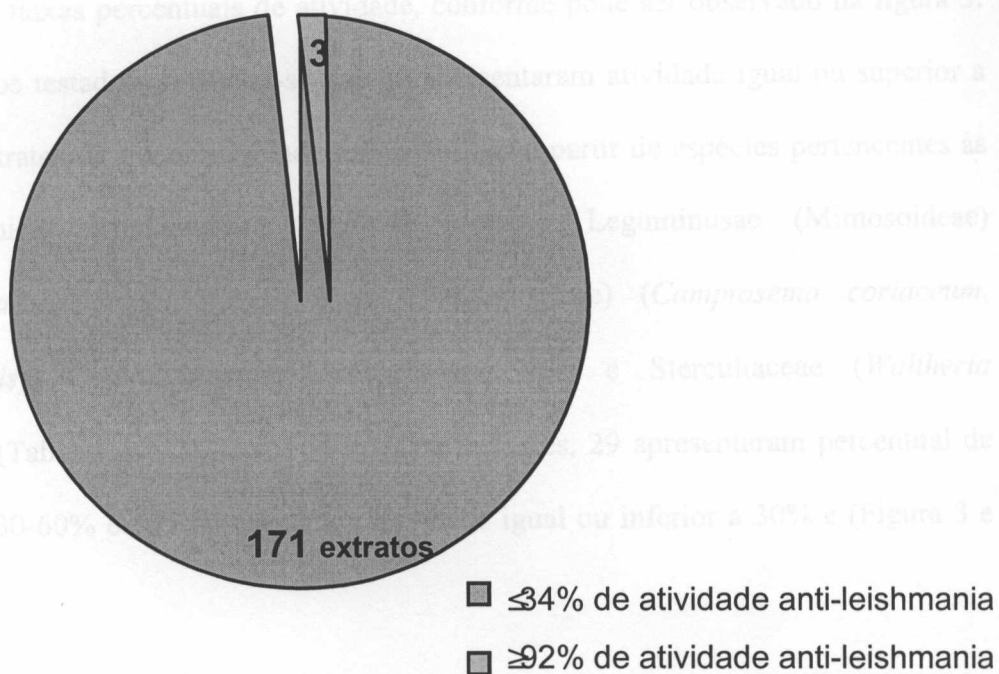


Figura 2: Avaliação da atividade anti-*L. amazonensis* de extratos de plantas do semi-árido brasileiro. Promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram incubados na presença ou ausência dos extratos durante 24 horas. A viabilidade foi mensurada com base no metabolismo do MTT. Os resultados foram agrupados em faixas percentuais de inibição do crescimento *in vitro* de *L. amazonensis* pelos 174 extratos testados.

5.2 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos de plantas do semi-árido brasileiro.

As atividades anti-*T. cruzi* de extratos dos vegetais do semi-árido brasileiro foram distribuídas em faixas percentuais de atividade, conforme pode ser observado na figura 3. Dos 174 extratos testados, verificou-se que 10 apresentaram atividade igual ou superior a 60%. Os 10 extratos de maior atividade foram obtidos a partir de espécies pertencentes às famílias botânicas Bignoniaceae (*Mansoa hirsuta*), Leguminosae (Mimosoideae) (*Anadenanthera colubrina*), Leguminosae (Papilonoideae) (*Camptosema coriaceum*, *Cratylia mollis*), Convolvulaceae (*Jacquemontia sp.*) e Sterculiaceae (*Waltheria brachypetala*) (Tabelas 1 e 2). Dos 164 extratos restantes, 29 apresentaram percentual de inibição entre 30-60% e 135 apresentaram atividade igual ou inferior a 30% e (Figura 3 e Tabelas).

5.1 Avaliação da atividade inibidora da produção de óxido nítrico

Das 174 extratos analisados, 10 apresentaram inibição da produção de óxido nítrico igual ou superior a 70% (Figura 4). Estes extratos foram obtidos a partir de vegetais

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

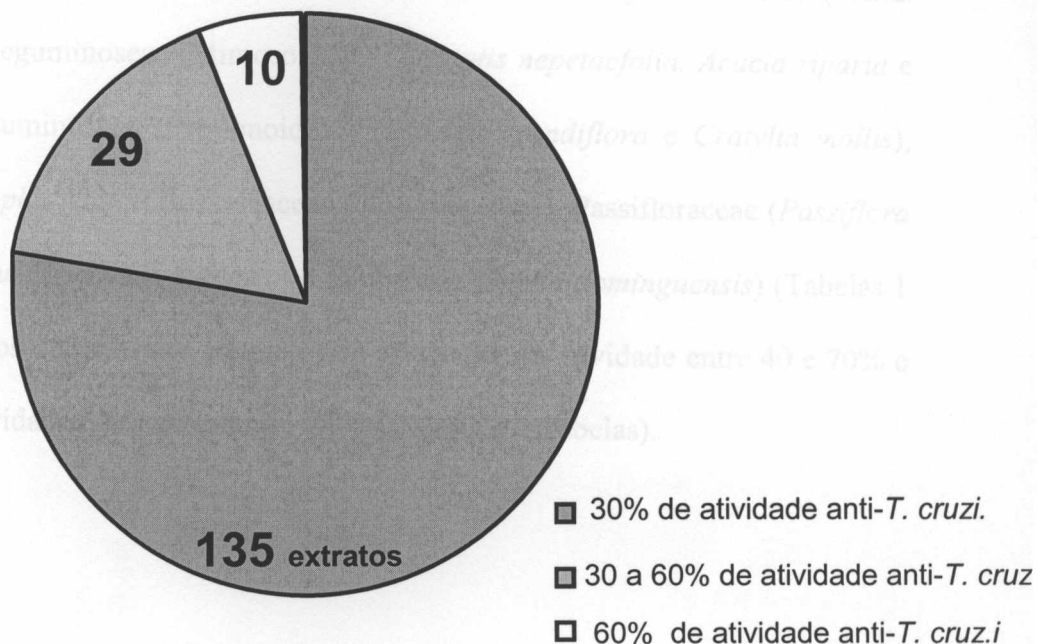


Figura 3: Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram incubadas na presença ou ausência dos extratos durante 24 horas. A viabilidade foi mensurada com base no metabolismo do MTT. Os 174 extratos testados foram agrupadas em faixas de percentuais de atividade anti-*T. cruzi*.

5.3 Avaliação da atividade inibidora da produção de óxido nítrico

Dos 174 extratos analisados, 16 apresentaram inibição da produção de óxido nítrico igual ou superior a 70% (Figura 4). Estes extratos foram obtidos a partir de vegetais pertencentes às famílias botânicas Acanthaceae (*Anisacanthus bresiliensis*), Alismataceae (*Echinodorus sp.*), Asteraceae (*Lepidaploa cotoneaster* e *vernonia cf. cotoneaster* (Willd. ex Spreng.) Less.), Leguminoseae (Mimosoideae) (*Leonotis nepetaefolia*, *Acacia riparia* e *Mimosa invisa*), Leguminoseae (Papilonoideae) (*Dioclea grandiflora* e *Cratylia mollis*), Euphorbiaceae (*Jatropha ribifolia*), Malvaceae (*Gossypium sp.*), Passifloraceae (*Passiflora cincinnata*), Rubiaceae (*Tocoyena formosa*) e Typhaceae (*Typha dominguensis*) (Tabelas 1 e 2). Em referência aos 158 extratos restantes, 23 apresentaram atividade entre 40 e 70% e 135 apresentaram atividade igual ou inferior a 40% (Figura 4 e Tabelas).

4.4 Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação

Dos 174 extratos analisados quanto à atividade inibidora da proliferação de linfócitos, 135 extratos demonstraram atividade inibidora da linfoproliferação, quais sejam, 135 extratos com inibição maior a 80% (Figura 5). Esses extratos são de espécies vegetais pertencentes às

Inibição da produção de óxido nítrico

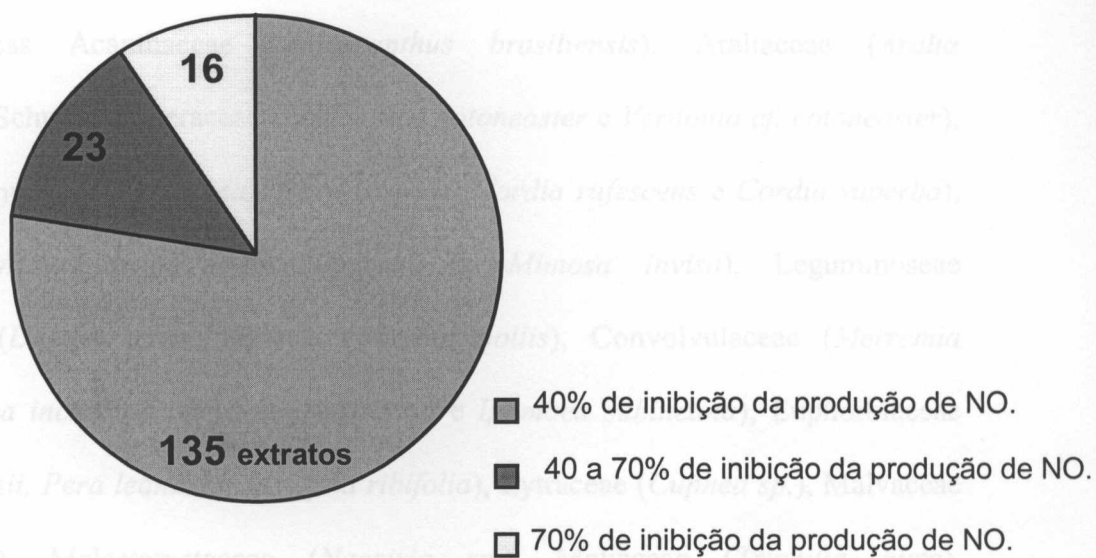


Figura 4: Avaliação de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro quanto à atividade inibidora da produção de óxido nítrico. Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos foram estimulados com IFN- γ e LPS na presença ou ausência dos 174 extratos, durante 24 horas. A produção de óxido nítrico foi estimada através da dosagem de nitrito pelo método de Griess. Os resultados em percentuais foram obtidos com base nos valores do controle estimulado e cultivado na ausência de droga.

5.4 Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação

Dos 174 extratos analisados quanto à atividade inibidora da proliferação de linfócitos ativados, 47 extratos demonstraram atividade inibidora da linfoproliferação iguais ou superiores a 80% (Figura 5). Estes extratos são de espécies vegetais pertencentes às famílias botânicas Acanthaceae (*Anisacanthus brasiliensis*), Araliaceae (*Aralia warmingiana* K. Schum.), Asteraceae (*Lepidaploa cotoneaster* e *Vernonia cf. cotoneaster*), Bignoniaceae (*Zeyheria tuberculosa*), Boraginaceae (*Cordia rufescens* e *Cordia superba*), Leguminosae (Mimosoideae) (*Acacia riparia* e *Mimosa invisa*), Leguminosae (Papilonoideae) (*Dioclea grandiflora* e *Cratylia mollis*), Convolvulaceae (*Merremia aegyptia*, *Ipomoea incarnata*, *Ipomoea brasiliana* e *Ipomoea subincana*), Euphorbiaceae (*Jatropha martiasii*, *Pera leandri* e *Jatropha ribifolia*), Lytraceae (*Cuphea sp.*), Malvaceae (*Gossypium sp.*), Melastomataceae (*Nacairia sp.*), Meliaceae (*Trichilia hirta*), Nymphaeaceae (*Nymphaea ampla*), Passifloraceae (*Passiflora cincinnata*), Poaceae (*Aristida sp.*), Polygalaceae (*Polygala sp.*), Portulacaceae (*Portulaca werdermannii*), Ulmaceae (*Celtis sp.* e *Trema micrantha*) e Verbenaceae (*Stachytarpheta bicolor* e *Lippia alnifolia*) (Tabelas 1 e 2). Dos 127 extratos restantes, 46 apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação entre 40 e 80% e 81 apresentaram atividade igual ou inferior a 40% (Figura 5; Tabelas).

Inibição da linfoproliferação

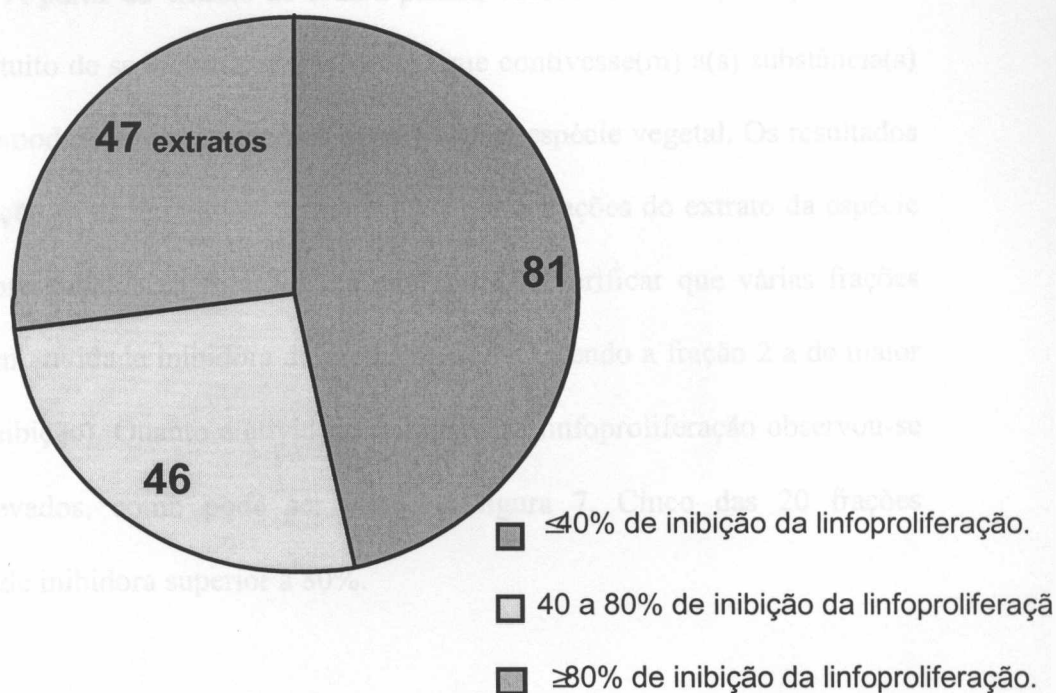


Figura 5: Avaliação de extratos de vegetais do semi-árido brasileiro quanto à atividade inibidora da proliferação de linfócitos ativados. Células de baço de camundongos foram estimuladas pelo mitógeno concanavalina A na presença ou ausência dos 174 extratos, durante 48 horas. A inibição da linfoproliferação foi determinada com base nos valores de incorporação de timidina por células estimuladas na ausência de droga.

5.5 Avaliação da atividade de frações da espécie *Passiflora cincinnata*.

Como visto anteriormente, extratos da espécie *Passiflora cincinnata* apresentaram atividade imunomoduladora elevada, tanto na inibição da produção de óxido nítrico quanto da linfoproliferação. A partir do extrato de toda a planta, obteve-se 20 frações que foram reavaliadas com o intuito de se identificar fração(ões) que contivesse(m) a(s) substância(s) com atividade imunomoduladora presente nos extratos desta espécie vegetal. Os resultados de inibição da produção de óxido nítrico demonstrados pelas frações do extrato da espécie *P. cincinnata* são apresentados na figura 6, na qual pode-se verificar que várias frações obtidas demonstraram atividade inibidora da produção de NO, sendo a fração 2 a de maior atividade (60% de inibição). Quanto à atividade inibidora da linfoproliferação observou-se valores bastante elevados, como pode ser visto na figura 7. Cinco das 20 frações apresentaram atividade inibidora superior a 80%.

Passiflora cincinnata

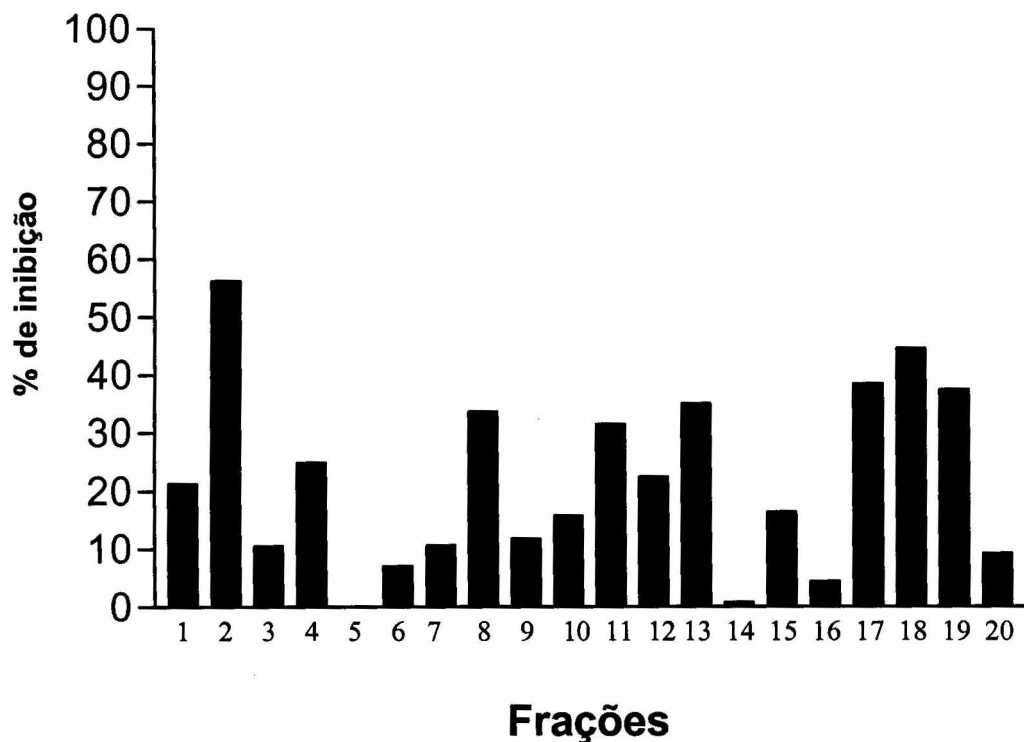


Figura 6: Avaliação de frações do extrato de *Passiflora cincinnata* quanto à atividade inibidora da produção de óxido nítrico. Foram obtidas frações a partir do extrato clorofórmico de toda a planta da espécie vegetal *Passiflora cincinnata*. Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongo foram incubados na presença ou ausência das frações obtidas e estimulados com IFN- γ e LPS. A produção de óxido nítrico foi determinada pelo método de Griess e os resultados em percentuais foram obtidos com base nos valores do controle estimulado e cultivado na ausência de droga.

Passiflora cincinnata

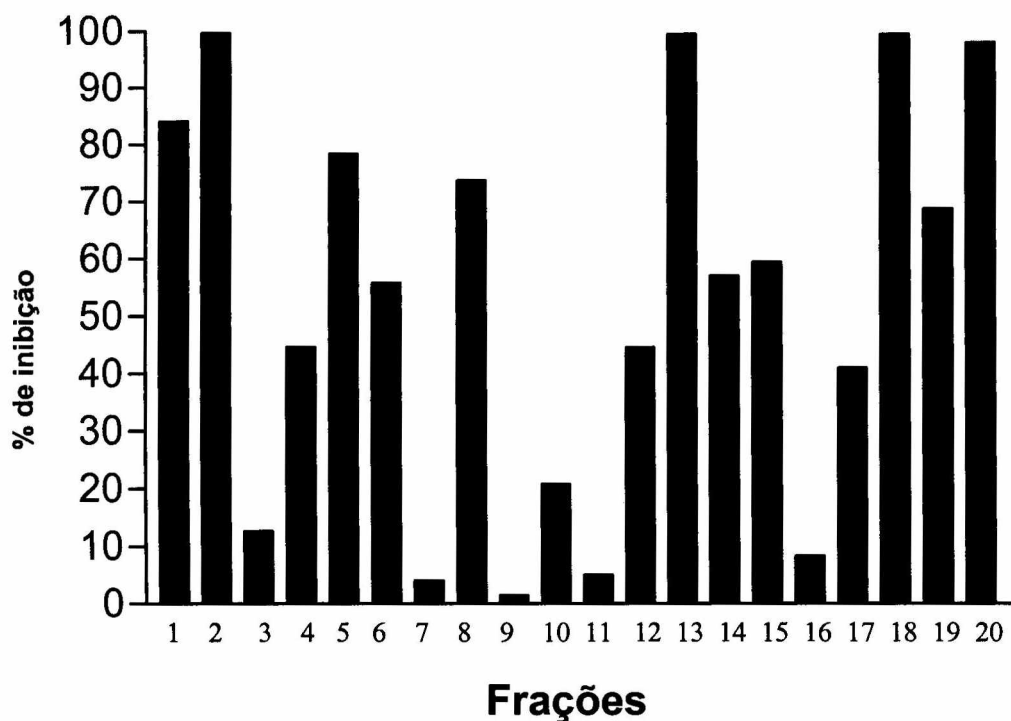


Figura 7: Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação de frações de extrato da espécie *Passiflora cincinnata*. O extrato clorofórmico de toda a planta foi fracionado. Células de baço de camundongos foram estimuladas com concanavalina A na presença ou ausência das frações, durante 48 horas. As culturas foram então pulsadas com timidina tritiada e incubadas durante 18 horas. Após este período, foi feita a contagem da radiação incorporada e a inibição da linfoproliferação foi determinada com base nos valores de incorporação de timidina por células estimuladas pelo mitógeno na ausência de droga.

5.6 Avaliação da atividade de frações da espécie *Nymphaea ampla*.

A espécie *N. ampla* foi uma das espécies cujo extrato apresentou elevada atividade inibidora da linfoproliferação. Desse modo, o extrato desta espécie também foi fracionado. Os resultados de inibição da linfoproliferação demonstrados pelas frações dos extratos da *N. ampla* são apresentados na figura 8, onde pode ser observado que a fração 4 é a de maior atividade (83%), embora outras frações tenham apresentado atividade acima de 50%.

Nymphaea ampla

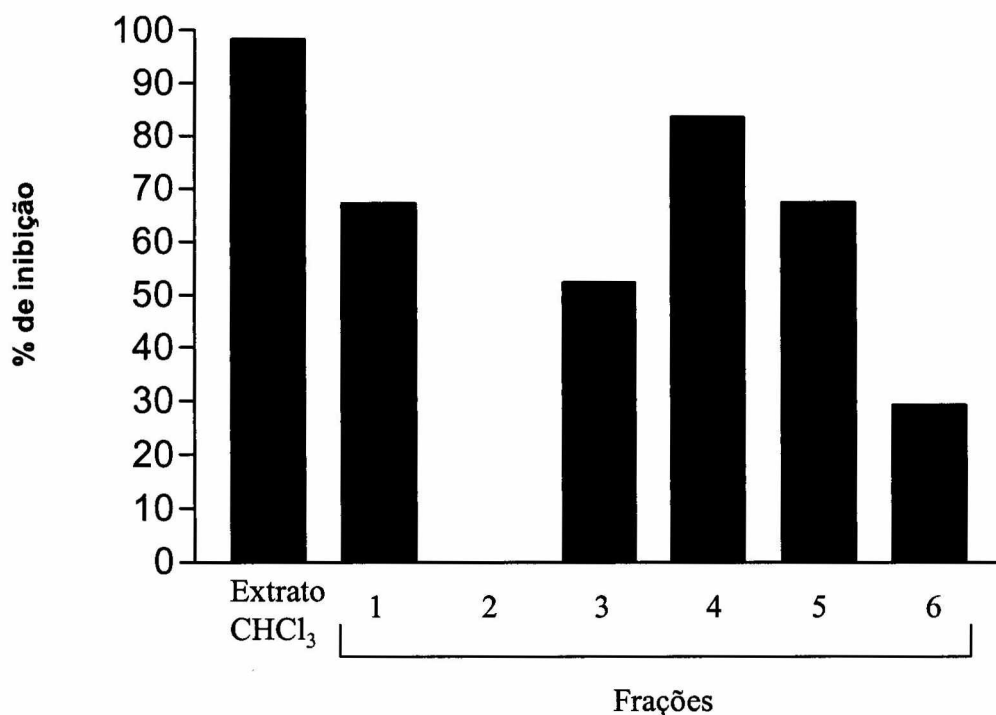


Figura 8. Avaliação da atividade inibidora da linfoproliferação de frações do extrato de *Nymphaea ampla*. O extrato clorofórmico de toda a planta da espécie *Nymphaea ampla* foi fracionado. Células de baço de camundongo foram estimuladas com concanavalina A na presença ou ausência das frações obtidas, durante 48 horas. As células foram novamente incubadas, por um período de 18 horas, após a adição de timidina tritiada às culturas. Após este período, foi feita a contagem da radiação incorporada. A inibição da linfoproliferação foi determinada com base nos valores de incorporação de timidina por células estimuladas pelo mitógeno, na ausência de droga.

Tabela 1: Identificações botânicas, partes do vegetal utilizadas e tipo do extrato analisado.

Nº	Extrato	P.Usada	Família	Espécie
1	A	F	Acanthaceae	<i>Anisacanthus brasiliensis</i> LINDAU
2	C	C	Acanthaceae	<i>Anisacanthus brasiliensis</i> LINDAU
3	A	C	Acanthaceae	<i>Anisacanthus brasiliensis</i> LINDAU
4	C	F	Acanthaceae	<i>Anisacanthus brasiliensis</i> LINDAU
5	C	F	Alismataceae	<i>Echinodorus</i> sp.
6	A	F	Alismataceae	<i>Echinodorus</i> sp.
7	C	F	Araceae	<i>Pistia stratiotes</i> L.
8	A	F	Araceae	<i>Pistia stratiotes</i> L.
9	A	R	Araliaceae	<i>Aralia warmingiana</i> K.Schum.
10	C	R	Araliaceae	<i>Aralia warmingiana</i> K.Schum.
11	A	F	Asteraceae	<i>Lepidaploa cotoneaster</i> (Will. Ex Spreng.) H. Rob.
12	C	F	Asteraceae	<i>Lepidaploa cotoneaster</i> (Will. Ex Spreng.) H. Rob.
13	A	F	Asteraceae	<i>Vernonia cf. cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) Less.
14	A	PA	Asteraceae	<i>Vernonia cf. cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) Less.
15	C	F	Asteraceae	<i>Vernonia cf. cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) Less.
16	C	PA	Asteraceae	<i>Vernonia cf. cotoneaster</i> (Willd. ex Spreng.) Less.
17	C	C	Bignoniaceae	<i>Zeyheria tuberculosa</i> (Vell.) Bur.
18	A	C	Bignoniaceae	<i>Zeyheria tuberculosa</i> (Vell.) Bur.
19	C	F	Bignoniaceae	<i>Mansoa hirsuta</i> DC
20	A	F	Bignoniaceae	<i>Mansoa hirsuta</i> DC
21	C	C	Boraginaceae	<i>Cordia superba</i> Cham.
22	A	C	Boraginaceae	<i>Cordia superba</i> Cham.
23	C	PA	Boraginaceae	<i>Cordia rufescens</i> A. DC
24	A	PA	Boraginaceae	<i>Cordia rufescens</i> A. DC
25	C	C	Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne
26	A	C	Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne
27	C	F	Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne
28	C	F	Caesalpiniaceae	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Mart.
29	A	F	Caesalpiniaceae	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Mart.
30	C	C	Caesalpiniaceae	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Mart.
31	A	C	Caesalpiniaceae	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Mart.
32	A	R	Caesalpiniaceae	<i>Chamaecrista brevicalyx</i> (Benth) I. & B.
33	C	R	Caesalpiniaceae	<i>Chamaecrista brevicalyx</i> (Benth) I. & B.
34	A	F	Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne
35	A	C	Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne
36	C	C	Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne
37	C	C	Caesalpiniaceae	<i>Senna obtusifolia</i> (L) Irwin & Barneby
38	A	F	Caesalpiniaceae	<i>Senna obtusifolia</i> (L) Irwin & Barneby
39	C	F	Caesalpiniaceae	<i>Senna obtusifolia</i> (L) Irwin & Barneby
40	A	C	Caesalpiniaceae	<i>Senna obtusifolia</i> (L) Irwin & Barneby
41	A	G	Caesalpiniaceae	<i>Senna acuruensis</i> (Benth.) I. & B. var. <i>acuruensis</i>
42	H	***	Caesalpiniaceae	<i>Senna cearensis</i>
43	A	***	Caesalpiniaceae	<i>Senna cearensis</i>

Extrato: A (acetato de etila), C (clorofórmio), H (hexano), M (metanol), SP (substância pura).

Parte Usada: F (folha), C (caule), R (ramos), PA (partes aéreas), G (galhos), C/R (caule/ramos), FL (flores), T (talos).

Nº	Extrato	P.Usada	Família	Espécie
44	M	***	Caesalpinaceae	<i>Senna cearensis</i>
45	C	F	Caesalpinaceae	<i>Bauhinia pulchella</i> Benth
46	A	F	Caesalpinaceae	<i>Bauhinia pulchella</i> Benth
47	C	C	Caesalpinaceae	<i>Bauhinia pulchella</i> Benth
48	A	C	Caesalpinaceae	<i>Bauhinia pulchella</i> Benth
49	C	PA	Convolvulaceae	<i>Jacquemontia</i> sp.
50	A	PA	Convolvulaceae	<i>Jacquemontia</i> sp.
51	C	F	Convolvulaceae	<i>Merremia aegyptia</i> (L.) Urban
52	A	F	Convolvulaceae	<i>Merremia aegyptia</i> (L.) Urban
53	C	F	Convolvulaceae	<i>Ipomoea incarnata</i> Vahl. Choisy
54	A	F	Convolvulaceae	<i>Ipomoea incarnata</i> Vahl. Choisy
55	C	PA	Convolvulaceae	<i>Ipomoea brasiliana</i> (Choisy) Meissn.
56	A	PA	Convolvulaceae	<i>Ipomoea brasiliana</i> (Choisy) Meissn.
57	C	PA	Convolvulaceae	<i>Ipomoea subincana</i> (Choisy) Meisn
58	A	PA	Convolvulaceae	<i>Ipomoea subincana</i> (Choisy) Meisn
59	SP	F	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum passerinum</i>
60	C	F	Euphorbiaceae	<i>Jatropha martiasii</i>
61	C	C	Euphorbiaceae	<i>Jatropha martiasii</i>
62	A	F	Euphorbiaceae	<i>Jatropha martiasii</i>
63	A	C	Euphorbiaceae	<i>Jatropha martiasii</i>
64	C	C	Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.
65	A	C	Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.
66	C	F	Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.
67	A	F	Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.
68	C	C	Euphorbiaceae	<i>Pera leandri</i> Baill
69	A	C	Euphorbiaceae	<i>Pera leandri</i> Baill
70	C	F	Euphorbiaceae	<i>Jatropha ribifolia</i> (Pohl) Baill.
71	A	F	Euphorbiaceae	<i>Jatropha ribifolia</i> (Pohl) Baill.
72	C	C	Fabaceae	<i>Periandra mediterranea</i> (Vell.)Taub.
73	C	C	Labiatae	<i>Platymiscium zehntneri</i> Harms
74	A	C	Labiatae	<i>Platymiscium zehntneri</i> Harms
75	C	F	Labiatae	<i>Hyptis martiusi</i> Muell. Arg.
76	A	F	Labiatae	<i>Hyptis martiusi</i> Muell. Arg.
77	C	C	Labiatae	<i>Hyptis martiusi</i> Muell. Arg.
78	A	C	Labiatae	<i>Hyptis martiusi</i> Muell. Arg.
79	C	G	Labiatae	<i>Hyptis leptostachys</i> Epling subsp. caatingae Harley
80	A	G	Labiatae	<i>Hyptis leptostachys</i> Epling subsp. caatingae Harley
81	C	C/R	Legum.-Mimosoideae	<i>Leonotis nepetaefolia</i>
82	A	C/R	Legum.-Mimosoideae	<i>Leonotis nepetaefolia</i>
83	C	F	Legum.-Mimosoideae	<i>Acacia riparia</i> Kunth
84	A	F	Legum.-Mimosoideae	<i>Acacia riparia</i> Kunth
85	C	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Acacia riparia</i> Kunth
86	A	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Acacia riparia</i> Kunth
87	C	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. cebil

Extrato: A (acetato de etila), C (clorofórmio), H (hexano), M (metanol), SP (substância pura).

Parte Usada: F (folha), C (caule), R (ramos), PA (partes aéreas), G (galhos), C/R (caule/ramos), FL (flores), T (talos).

Nº	Extrato	P.Usada	Família	Espécie
88	A	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
89	C	F	Legum.-Mimosoideae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
90	A	F	Legum.-Mimosoideae	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
91	C	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Mimosa invisa</i> Mart. ex Colla
92	A	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Mimosa invisa</i> Mart. ex Colla
93	C	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Mimosa gemmulata</i> Barneby-var. <i>gemmulata</i>
94	A	C	Legum.-Mimosoideae	<i>Mimosa gemmulata</i> Barneby-var. <i>gemmulata</i>
95	C	F	Legum.-Papilionoideae	<i>Dioclea grandiflora</i>
96	A	F	Legum.-Papilionoideae	<i>Dioclea grandiflora</i>
97	C	F	Legum.-Papilionoideae	<i>Camptosema coriaceum</i> (Nees & Mart.) Benth.
98	A	F	Legum.-Papilionoideae	<i>Camptosema coriaceum</i> (Nees & Mart.) Benth.
99	C	F	Legum.-Papilionoideae	<i>Cratylia mollis</i> Mart. Ex Benth
100	A	F	Legum.-Papilionoideae	<i>Cratylia mollis</i> Mart. Ex Benth
101	C	PA	Lytraceae	<i>Cuphea</i> sp.
102	A	PA	Lytraceae	<i>Cuphea</i> sp.
103	C	F	Malvaceae	<i>Gossypium</i> sp.
104	A	F	Malvaceae	<i>Gossypium</i> sp.
105	A	C	Melastomataceae	<i>Nacairia</i> sp.
106	A	F	Melastomataceae	<i>Nacairia</i> sp.
107	C	F	Meliaceae	<i>Trichilia hirta</i> L.
108	A	F	Meliaceae	<i>Trichilia hirta</i> L.
109	A	F	Nymphaeaceae	<i>Nymphaea ampla</i> (Salisb) DC.
110	C	F	Nymphaeaceae	<i>Nymphaea ampla</i> (Salisb) DC.
111	C	Toda a planta	Nymphaeaceae	<i>Nymphaea ampla</i> (Salisb) DC.
112	A	F	Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i> Mart.
113	C	F	Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i> Mart.
114	A	C	Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i> Mart.
115	C	C	Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i> Mart.
116	C	FL	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
117	A	FL	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
118	C	F	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
119	A	F	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
120	C	C	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
121	A	C	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
122	C	R	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
123	A	R	Poaceae	<i>Aristida</i> sp.
124	C	F	Polygalaceae	<i>Bredemeyera</i> sp.
125	A	F	Polygalaceae	<i>Bredemeyera</i> sp.
126	C	F	Polygalaceae	<i>Polygala</i> sp.
127	A	F	Polygalaceae	<i>Polygala</i> sp.
128	A	F	Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i> Benth.
129	C	F	Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i> Benth.
130	C	F	Pontederiaceae	<i>Eichhornia paniculata</i> L.
131	A	F	Pontederiaceae	<i>Eichhornia paniculata</i> L.
132	C	PA	Portulacaceae	<i>Portulaca hirsutissima</i> DC.
133	A	PA	Portulacaceae	<i>Portulaca werdermannii</i>

Extrato: A (acetato de etila), C (clorofórmio), H (hexano), M (metanol), SP (substância pura).

Parte Usada: F (folha), C (caule), R (ramos), PA (partes aéreas), G (galhos), C/R (caule/ramos), FL (flores), T (talos).

Nº	Extrato	P.Usada	Família	Espécie
134	C	PA	Portulacaceae	<i>Portulaca werdermannii</i>
135	A	F	Rhamnaceae	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.
136	C	F	Rhamnaceae	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.
137	C	F	Rubiaceae	<i>Tocoyena formosa</i> (Cham. & Schul.) K. Schum
138	A	F	Rubiaceae	<i>Tocoyena formosa</i> (Cham. & Schul.) K. Schum
139	C	PA	Rubiaceae	<i>Mitracarpus</i> sp.
140	A	PA	Rubiaceae	<i>Mitracarpus</i> sp.
141	A	F	Rutaceae	<i>Esenbeckia grandiflora</i> St. Hil.
142	C	F	Rutaceae	<i>Esenbeckia grandiflora</i> St. Hil.
143	A	F	Rutaceae	<i>Galipea simplicifolia</i> (NEES & MART) Engl
144	C	F	Rutaceae	<i>Galipea simplicifolia</i> (NEES & MART) Engl
145	A	F	Rutaceae	<i>Pilocarpus spicatus</i> A. St. Hil.
146	A	G	Rutaceae	<i>Pilocarpus spicatus</i> A. St. Hil.
147	C	F	Rutaceae	<i>Pilocarpus spicatus</i> A. St. Hil.
148	C	G	Rutaceae	<i>Pilocarpus spicatus</i> A. St. Hil.
149	H	***	Solanaceae	<i>Solanum crinitum</i> Lam.
150	C	F	Sterculiaceae	<i>Helicteres</i> sp.
151	A	F	Sterculiaceae	<i>Helicteres</i> sp.
152	C	C	Sterculiaceae	<i>Helicteres</i> sp.
153	A	C	Sterculiaceae	<i>Helicteres</i> sp.
154	C	F	Sterculiaceae	<i>Waltheria brachypetala</i> Turcz.
155	A	F	Sterculiaceae	<i>Waltheria brachypetala</i> Turcz.
156	C	T	Sterculiaceae	<i>Waltheria brachypetala</i> Turcz.
157	A	T	Sterculiaceae	<i>Waltheria brachypetala</i> Turcz.
158	C	F	Sterculiaceae	<i>Melochia</i> sp.
159	A	F	Sterculiaceae	<i>Melochia</i> sp.
160	A	F	Sterculiaceae	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.
161	C	F	Sterculiaceae	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.
162	C	C	Typhaceae	<i>Typha dominguensis</i> Pers.
163	A	C	Typhaceae	<i>Typha dominguensis</i> Pers.
164	C	F	Typhaceae	<i>Typha dominguensis</i> Pers.
165	A	F	Typhaceae	<i>Typha dominguensis</i> Pers.
166	C	F	Ulmaceae	<i>Celtis</i> sp.
167	A	F	Ulmaceae	<i>Celtis</i> sp.
168	C	F	Ulmaceae	<i>Trema micrantha</i> Blume
169	C	PA	Verbenaceae	<i>Stachytarpheta bicolor</i> Hook f.
170	A	PA	Verbenaceae	<i>Stachytarpheta bicolor</i> Hook f.
171	A	C	Verbenaceae	<i>Lippia alnifolia</i> Wawra
172	C	C	Verbenaceae	<i>Lippia alnifolia</i> Wawra
173	A	F	Verbenaceae	<i>Lippia alnifolia</i> Wawra
174	C	F	Verbenaceae	<i>Lippia alnifolia</i> Wawra

Extrato: A (acetato de etila), C (clorofórmio), H (hexano), M (metanol), SP (substância pura).

Parte Usada: F (folha), C (caule), R (ramos), PA (partes aéreas), G (galhos), C/R (caule/ramos), FL (flores), T (talos).

Tabela 2: Resultados dos ensaios de imunomodulação e atividade antiparasitária dos extratos testados.

Nº	[mg/mL]	% Inib. NO	% Inib. Linfo.	% Tripanocida	% Leishmanicida
1	0,01	56,61	69,98	NA	NA
2	0,005	75,26	24,96	NA	NA
3	0,05	NA	92,06	NA	NA
4	0,01	5,87	61,43	NA	NA
5	0,005	NA	63,29	NA	NA
6	0,05	NA	78,14	NA	NA
7	0,01	30,20	NA	5,31	NA
8	0,01	11,33	NA	23,89	NA
9	0,01	22,31	90,34	NA	NA
10	0,01	24,98	67,79	NA	NA
11	0,1	29,90	99,04	NA	NA
12	0,1	72,92	99,65	NA	31,88
13	0,1	65,64	98,49	NA	NA
14	0,05	NA	96,35	NA	NA
15	0,001	8,72	NA	NA	NA
16	0,1	90,24	99,98	NA	6,92
17	0,01	4,49	91,50	50,45	8,88
18	0,01	16,39	55,53	7,66	17,76
19	0,001	5,82	20,55	65,02	2,80
20	0,001	NA	0,53	66,37	4,20
21	0,005	NA	63,23	NA	NA
22	0,05	NA	89,99	NA	NA
23	0,01	9,62	99,34	NA	NA
24	0,01	1,93	42,25	NA	NA
25	0,01	29,83	4,33	8,96	NA
26	0,01	NA	20,87	NA	NA
27	0,005	NA	64,53	NA	NA
28	0,01	NA	NA	NA	NA
29	0,01	2,83	NA	NA	NA
30	0,01	9,70	NA	10,62	NA
31	0,01	6,47	NA	12,39	NA
32	0,01	17,60	46,23	NA	NA
33	0,01	7,87	90,83	NA	NA
34	0,01	NA	4,56	NA	NA
35	0,01	7,93	4,15	NA	NA
36	0,01	15,10	NA	27,43	NA
37	0,01	9,07	96,20	NA	NA
38	0,01	NA	41,54	NA	NA
39	0,01	6,27	45,33	NA	NA
40	0,01	NA	94,32	NA	NA
41	0,01	NA	10,41	NA	NA
42	0,01	22,22	43,74	56,33	11,14

N°	[mg/mL]	% Inib. NO	% Inib. Linfo.	% Tripanocida	% Leishmanicida
43	0,01	NA	36,85	54,63	11,14
44	0,01	NA	24,16	52,55	6,29
45	0,01	40,24	5,55	68,47	NA
46	0,01	0,74	9,90	59,46	4,63
47	0,1	100,00	99,92	7,21	33,20
48	0,01	NA	8,25	31,95	NA
49	0,01	27,57	35,24	78,83	15,83
50	0,01	4,92	52,99	52,25	16,99
51	0,01	9,62	99,77	NA	NA
52	0,1	12,62	99,89	NA	NA
53	0,01	6,63	98,75	20,48	NA
54	0,1	11,76	97,70	NA	NA
55	0,1	69,13	99,46	NA	NA
56	0,01	8,88	46,64	NA	10,14
57	0,01	12,66	NA	NA	10,22
58	0,1	42,47	98,33	NA	NA
59	0,1	15,49	36,96	21,39	5,88
60	0,01	22,41	99,13	NA	NA
61	0,01	59,81	61,96	NA	NA
62	0,005	NA	3,29	NA	NA
63	0,01	NA	NA	NA	NA
64	0,01	19,25	NA	NA	NA
65	0,01	8,31	2,11	NA	NA
66	0,001	NA	NA	NA	NA
67	0,01	7,55	NA	NA	NA
68	0,01	0,64	53,26	NA	12,74
69	0,1	16,46	99,85	5,86	NA
70	0,01	13,72	65,77	NA	NA
71	0,1	83,01	97,92	NA	11,76
72	0,001	1,25	51,25	NA	NA
73	0,1	48,33	99,57	NA	NA
74	0,1	22,37	97,43	NA	NA
75	0,001	13,33	36,29	53,50	10,86
76	0,001	13,33	2,47	55,39	11,43
77	0,001	8,89	1,74	59,74	7,71
78	0,001	NA	NA	45,75	NA
79	0,001	8,89	18,84	49,34	NA
80	0,01	2,22	32,06	51,42	4,00
81	0,01	31,01	43,35	52,91	0,70
82	0,1	100,00	67,31	37,67	NA
83	0,01	65,57	NA	44,59	8,11
84	0,1	83,46	98,80	12,61	NA
85	0,01	11,11	83,62	44,99	12,86
86	0,01	0,00	16,45	49,53	NA
87	0,01	40,70	20,71	64,41	10,81

NA (não apresenta).

N°	[mg/mL]	% Inib. NO	% Inib. Linfo.	% Tripanocida	% Leishmanicida
88	0,01	5,50	53,95	5,22	14,31
89	0,001	24,22	28,11	50,90	11,97
90	0,01	41,67	60,32	62,61	9,65
91	0,1	80,85	99,88	NA	0,79
92	0,01	0,74	9,79	36,49	3,47
93	0,01	64,44	57,37	NA	NA
94	0,001	NA	NA	NA	NA
95	0,001	64,44	12,40	30,04	23,08
96	0,1	100,00	90,85	NA	NA
97	0,001	7,45	8,13	76,58	13,51
98	0,1	68,55	60,10	61,71	10,04
99	0,001	47,48	31,69	61,88	NA
100	0,1	100,00	80,00	21,08	NA
101	0,01	NA	NA	NA	97,10
102	0,1	NA	96,03	NA	NA
103	0,1	81,22	99,95	NA	NA
104	0,1	33,60	38,17	NA	NA
105	0,1	NA	96,57	NA	NA
106	0,1	NA	95,40	NA	NA
107	0,01	NA	40,41	NA	NA
108	0,1	30,40	95,27	NA	NA
109	0,01	NA	99,86	NA	NA
110	0,01	2,43	NA	NA	NA
111	0,1	40,09	98,27	NA	NA
112	0,01	NA	56,19	NA	NA
113	0,005	89,67	99,87	NA	NA
114	0,01	19,21	72,36	NA	NA
115	0,01	70,49	NA	NA	NA
116	0,001	13,33	30,33	27,03	10,00
117	0,001	4,44	24,74	26,28	3,71
118	0,01	4,44	65,12	28,36	16,57
119	0,01	NA	81,28	28,17	11,71
120	0,001	22,22	29,64	26,65	4,00
121	0,01	4,44	31,73	29,87	10,86
122	0,001	NA	20,97	24,01	8,00
123	0,001	NA	14,00	9,64	NA
124	0,001	3,64	70,69	4,29	NA
125	0,01	2,78	58,22	NA	NA
126	0,01	7,91	90,60	11,90	NA
127	0,01	2,35	47,91	NA	NA
128	0,01	22,41	38,81	NA	NA
129	0,005	NA	77,84	NA	NA
130	0,01	NA	NA	NA	NA
131	0,1	7,91	76,15	11,90	NA
132	0,01	1,97	32,94	NA	95,65

NA (não apresenta).

Nº	[mg/mL]	% Inib. NO	% Inib. Linfo.	% Tripanocida	% Leishmanicida
133	0,01	NA	49,29	NA	NA
134	0,1	16,28	98,51	NA	92,75
135	0,01	53,33	8,87	15,69	7,71
136	0,01	37,78	70,50	3,59	NA
137	0,001	45,54	16,46	43,50	9,09
138	0,1	100,00	55,28	46,64	NA
139	0,001	NA	10,51	NA	NA
140	0,01	NA	52,58	NA	NA
141	0,01	51,98	14,19	NA	NA
142	0,001	7,36	NA	NA	NA
143	0,1	10,90	78,42	12,38	NA
144	0,005	70,46	NA	NA	NA
145	0,01	57,32	17,22	NA	NA
146	0,001	3,19	39,55	NA	NA
147	0,005	NA	NA	NA	NA
148	0,005	NA	61,47	NA	NA
149	0,001	NA	NA	29,49	NA
150	0,001	NA	NA	20,35	NA
151	0,01	11,03	1,09	NA	NA
152	0,001	15,11	NA	NA	NA
153	0,01	8,58	17,16	NA	11,32
154	0,001	16,39	31,21	62,61	23,94
155	0,01	24,22	19,89	31,08	17,76
156	0,001	10,66	32,30	48,65	9,27
157	0,01	2,22	29,49	54,06	NA
158	0,001	2,91	33,29	55,86	28,19
159	0,01	44,57	43,70	43,95	NA
160	0,01	0,00	70,41	16,26	NA
161	0,001	NA	0,59	28,54	NA
162	0,005	84,87	36,89	NA	NA
163	0,005	NA	76,38	NA	NA
164	0,01	66,22	69,72	NA	NA
165	0,005	NA	51,07	NA	NA
166	0,01	NA	99,97	5,31	NA
167	0,01	3,64	NA	NA	NA
168	0,01	40,36	99,18	34,52	NA
169	0,01	3,64	92,58	NA	NA
170	0,1	12,19	98,41	NA	NA
171	0,1	43,59	98,76	NA	NA
172	0,01	33,27	28,08	NA	NA
173	0,1	29,77	48,96	NA	NA
174	0,01	30,67	97,78	NA	NA

NA (não apresenta).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro estudo farmacológico da flora da região do semi-árido brasileiro realizado de forma sistematizada e direcionado para o potencial anti-parasitário e imunomodulador de um grande número de espécies endêmicas ou nativas. Destaca-se também o fato de que a equipe envolvida é composta por profissionais das áreas de botânica, química, imunologia e farmacologia, um grupo multidisciplinar, aspecto fundamental para o estudo farmacológico de vegetais.

Para o estudo, foram obtidos basicamente extratos clorofórmico e acetato de etila dos vegetais. Não foi possível observar predominância de atividades de extratos de um dos solventes, uma vez que estes apresentaram-se ativos em proporções semelhantes. Dos extratos ativos analisados, 45% foram extratos acetato de etila e 52% foram extratos clorofórmicos. Quanto aos extratos ativos, observou-se que 25% dos extratos apresentaram atividade imunomoduladora (inibição da produção de NO e da linfoproliferação). Dezesesseis extratos (9%) apresentaram atividade inibidora da produção de óxido nítrico igual ou superior a 70% e 47 extratos (27%) apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação igual ou superior a 80%.

Do total de amostras analisadas e em referência à imunomodulação, 55 apresentaram elevados valores para pelo menos uma das atividades (inibição da produção de NO ou inibição da linfoproliferação) e 10 destes 55 apresentaram elevados valores para ambas as atividades ($\geq 70\%$ para inibição da produção de NO e $\geq 80\%$ para inibição da linfoproliferação).

No caso específico da linfoproliferação, pode-se questionar o elevado número de extratos e frações ativas. Deve-se considerar que existe a possibilidade de uma ação

inespecífica de substâncias presentes no extrato ou fração, tendo em vista que algumas moléculas podem estar agindo de forma a impedir que o mitógeno utilizado (concanavalina A) ligue-se às moléculas que levariam à estimulação dos linfócitos, e não por um mecanismo direto de inibição de ativação linfocitária. Para confirmar o efeito supressor, as frações e os extratos serão submetidos a ensaios de linfoproliferação por estimulação com antígeno e de reações mistas linfocitárias, nos quais poderá ser observada a existência ou não da atividade em questão.

Quanto à atividade inibidora do crescimento dos parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, 10 extratos apresentaram-se ativos contra o *T. cruzi* e somente 3 extratos mostraram-se ativos contra a *L. amazonensis*, em percentuais iguais ou superiores a 60%. Pode-se associar a reduzida quantidade de extratos ativos à dificuldade existente na descoberta de moléculas que interferem especificamente no metabolismo desses parasitos de forma a induzi-los à morte. Os extratos ativos serão submetidos a ensaios com outras formas parasitárias (amastigotas de *L. amazonensis* e tripomastigota de *T. cruzi*) e também com outras espécies de *Leishmania* e cepas de *T. cruzi*, no intuito de se avaliar a amplitude de sua ação nesses parasitos. Os extratos ativos serão fracionados com o objetivo de identificar a(s) substância(s) ativa(s).

Considerando as quatro atividades analisadas (inibição da produção de NO, inibição da linfoproliferação, atividade anti-*T. cruzi* e anti-*L. amazonensis*), pode-se destacar algumas famílias das quais identificou-se espécies com extratos ativos. Das famílias avaliadas, a Caesalpiniaceae e a Papilonoideae apresentaram espécies com extratos ativos para as quatro atividades investigadas. Espécies das famílias Asteraceae, Fabaceae e Mimosaceae apresentam extratos ativos para três das atividades analisadas. É possível ainda verificar que extratos de espécies das famílias Acanthaceae, Euphorbiaceae,

Malvaceae, Passifloraceae, Convolvulaceae, Lytraceae, Malvaceae, Portulacaceae e Sterculiaceae são ativos para pelo menos duas das atividades investigadas. No que consta na base de dados analisada (PUBMED-<http://www.nlm.nih.gov>), nenhuma das espécies estudadas são objeto de relatos na literatura de utilização em medicina popular relacionada com as atividades analisadas no presente trabalho.

Tabela 3: Apresentação dos resultados obtidos com as espécies estudadas neste trabalho e informações disponíveis na literatura acerca de atividade biológica para espécies da família.

Família	Espécie	Efeito observado ^{referência}
Asteraceae	<i>Lepidaploa cotoneaster</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Vernonia cinerea</i>	Atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória ²
	<i>Vernonia kotschyana</i>	Atividade imunomoduladora ³
	<i>Solidago chilensis</i>	Atividade gastroprotetora ⁴
	<i>Solidago chilensis</i>	Atividade antiinflamatória, espasmolítica e diurética ⁵
Bignoniaceae	<i>Zeyheria tuberculosa</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹ e Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ¹
	<i>Mansoa hirsuta</i>	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> . ¹
	<i>Tabebuia</i>	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ⁶
	<i>Tabebuia avellanedae</i>	Atividade antinociceptiva e antiedematogênica ⁷
Boraginaceae	<i>Cordia superba</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Cordia rufescens</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Cordia myxa</i>	Atividade antiinflamatória ⁸
	<i>Cordia curassavica</i>	Atividade antiedematogênica ⁹
	<i>Cordia verbenaceae</i>	Atividade antiinflamatória ¹⁰
	<i>Cordia francisci</i>	Atividade analgésia e antiinflamatória ¹¹
	<i>Cordia serratifolia</i>	Atividade analgésia e antiinflamatória ¹¹
Caesalpinaceae	<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Chamaecrista brevicalyx</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Senna obtusifolia</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Senna cearensis</i>	Atividade anti- <i>L. amazonensis</i> ¹
	<i>Bauhinia pulchella</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹ , inibidora da produção de NO ¹ ; Atividade anti <i>L. amazonensis</i> ¹
	<i>Bauhinia teratopotensis</i>	Atividade antiinflamatória ¹⁴
	<i>Bauhinia variegata</i>	Atividade antiinflamatória ¹⁵
	<i>Bauhinia racemosa</i>	Atividade antiulcerogênica ¹⁶

Euphorbiaceae	<i>Jatropha martiasii</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Jatropha ribifolia</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹ e inibidora da produção de NO ¹
	<i>Pera leandri</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
Leg. Papilonoideae	<i>Camptosema coriaceum</i>	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ¹ e inibidora da produção de NO ¹
	<i>Cratylia mollis</i>	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ¹ , atividade inibidora da linfoproliferação e inibidora da produção de NO ¹
	<i>Platymiscium zehntneri</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Dioclea grandiflora</i>	Atividade inibidora da produção de NO e inibidora da linfoproliferação ¹ ; Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ¹
Mimosaceae	<i>Acacia riparia</i>	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ¹ , atividade inibidora da produção de NO e inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> ¹
	<i>Mimosa invisa</i>	Atividade inibidora da produção de NO e inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Leucaena leucocephala</i>	Atividade antiinflamatória ¹²
Nymphaeaceae	<i>Nymphaea ampla</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Nuphar pumilum</i>	Atividade imunossupressora ¹⁴
Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹ e inibidora da produção de NO ¹
	<i>Passiflora incarnata</i>	Atividade anti-asmática ¹³
Rutaceae	<i>Galipea simplicifolia</i>	Atividade inibidora da linfoproliferação ¹
	<i>Citrus limon</i>	Atividade inibidora da produção de NO ¹⁷

Esta dissertação¹; IWALEWA *et al.*, 2003²; Frutuoso *et al.*, 1994³; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2002⁵; SANTOS *et al.*, 2001⁶; CHIARI *et al.*, 1991⁶; PINTO *et al.*, 2000⁶; DE MIRANDA *et al.*, 2001⁷; AL-AWADI *et al.*, 2001⁸; BAYEUX *et al.*, 2002⁹; SERTIÉ *et al.*, 1990¹⁰; FICARRA *et al.*, 1995¹¹; OLIVA *et al.*, 2000¹²; DHAWAN *et al.*, 2003¹³; SOSA *et al.*, 2002¹⁴; YADAVA & REDDY, 2003¹⁵; AKHTAR & AHMAD, 1995¹⁶; MIYAKE *et al.*, 1999¹⁷

Extratos acetato de etila e clorofórmico de folhas da espécie *Lepidaploa cotoneaster* (Asteraceae) apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação de 99%. Extrato da espécie *Lepidaploa cotoneaster* (Asteraceae), antigamente denominada *Vernonia condensata*, foi também analisado. O extrato clorofórmico das partes aéreas demonstrou atividade inibidora da linfoproliferação, em valor muito próximo ao extrato clorofórmico de folhas, obtido de um outro indivíduo identificado como *Lepidaploa cotoneaster*. Estes resultados confirmam uma tendência já documentada à biossíntese de substâncias imunomoduladoras por espécies da referida família: na espécie *Vernonia cinerea* observou-se propriedades analgésica, antipirética e antiinflamatória (IWALEWA *et al.*, 2003); na *Vernonia condensata*, verificou-se efeito analgésico e antiulcerogênico (FRUTUOSO *et al.*, 1994) e na *Vernonia kotschyana*, demonstrou-se atividade imunomoduladora (NERGARD *et al.*, 2004). A solidagenona, diterpeno labdano extraído da *Solidago chilensis* Meyen, apresenta efeito gastroprotetor em modelo de lesão induzida em camundongos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2002). O extrato da espécie *Solidago gigantea* apresenta elevada atividade antiinflamatória, espasmolítica e diurética (LEUSCHNER, 1995).

O extrato clorofórmico do caule da espécie *Zeyheria tuberculosa*, da família Bignoniaceae, apresentou 91% de atividade inibidora da linfoproliferação e 50% de atividade inibidora do crescimento do parasita *T. cruzi*. Analisou-se também o extrato clorofórmico e acetato de etila das folhas de outra espécie desta família, a *Mansoa hirsuta*, e verificou-se atividade inibidora do crescimento do *T. cruzi* em torno de 65%. De acordo com a literatura, as naftoquinonas, substâncias produzidas por espécies do gênero *Tabebuia*, pertencente a esta mesma família, são ativas contra o *T. cruzi* (SANTOS *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2000; CHIARI *et al.*, 1991). Extratos de cascas da espécie *Tabebuia*

avellanadae apresentam atividade antinociceptiva e antiedematogênica (DE MIRANDA *et al.*, 2001). Em conjunto, estes resultados indicam que diferentes espécies da família possuem atividades imunomoduladora e antiparasitária.

Em referência à família Boraginaceae, verificou-se atividade inibidora da linfoproliferação para extratos das espécies *Cordia superba* e *Cordia rufescens*. Já foram anteriormente relatadas atividades imunomoduladoras para espécies do gênero e o extrato da espécie *Cordia myxa* apresentou atividade antiinflamatória em modelo de colite induzida em ratos (AL-AWADI *et al.*, 2001). A artemetina, substância extraída da *Cordia curassavica*, apresenta atividade antiedematogênica (BAYEUX *et al.*, 2002). Para a espécie *Cordia verbenaceae*, verificou-se atividade antiinflamatória oral e tópica (SERTIÉ *et al.*, 1991). Também foram verificadas atividades analgésica e antiinflamatória para extratos das folhas das espécies *Cordia francisci* e *Cordia serratifolia* (FICARRA *et al.*, 1995).

Da família Mimosaceae, a espécie *Acacia riparia* teve seus extratos de folhas e caule testados. O extrato clorofórmico das folhas apresentou atividade inibidora do crescimento de *T. cruzi*. Já o extrato acetato de etila apresentou elevada atividade imunomoduladora. O extrato clorofórmico e acetato de etila do caule apresentaram atividade inibidora da produção de NO e atividade inibidora do crescimento de *T. cruzi*. Da espécie *Anadenanthera colubrina*, os extratos de caule e folha analisados apresentaram atividade inibidora do crescimento do *T. cruzi*. O extrato clorofórmico da espécie *Mimosa invisa* apresentou elevadas atividades inibidoras da produção de NO e da linfoproliferação. OLIVA *et al.* (2000) isolaram da *Leucaena leucocephala*, espécie da família Mimosaceae, uma substância que apresenta atividade antiinflamatória.

Um representante da família Leguminosae (Papilonoideae), a espécie *Camptosema coriaceum* apresentou extratos com atividade inibidora do crescimento do *T. cruzi* e

também atividade inibidora da produção de NO. Outra espécie, a *Cratylia mollis*, teve extratos com atividade inibidora do crescimento do *T. cruzi* e atividade imunomoduladora. Os extratos da espécie *Platymiscium zehntneri* apresentaram elevadas atividades inibidoras da linfoproliferação. A análise do extrato de folhas da espécie *Dioclea grandiflora* demonstrou também atividades imunomoduladoras e antiparasitária contra o *T. cruzi* (100% de atividade inibidora da produção de NO e 90% de atividade inibidora da linfoproliferação). Em conjunto, estes resultados ressaltam o potencial bioativo de moléculas sintetizadas por espécies dessa família.

As espécies da família Euphorbiaceae investigadas, *Jatropha martiasii*, *Jatropha ribifolia* e *Pera leandri*, apresentaram acentuadas atividades imunomoduladoras. Apesar de terem sido descritas atividades antiparasitárias para espécies dessa família, esta atividade não foi detectada neste estudo. Em contrapartida, não há relatos na literatura para atividade imunomoduladora de espécies deste táxon.

Da família Passifloraceae, a espécie *Passiflora cincinnata* apresentou extratos e frações com elevada atividade imunomoduladora. É bastante comum na literatura o relato de substâncias puras extraídas de espécies pertencentes a esta família (DHAWAN *et al.*, 2001a,b,c). Um relato recente demonstrou atividade antiasmática do extrato de folhas da espécie *Passiflora incarnata* (DHAWAN *et al.*, 2003).

A família Nymphaeaceae, representada pela espécie *Nymphaea ampla*, teve o extrato clorofórmico de toda a planta e também frações desse extrato analisados. Tanto o extrato quanto frações demonstraram atividade inibidora da linfoproliferação. Apesar de poucos estudos relacionados à atividade biológica, existe na literatura a referência de atividade imunossupressora para substâncias isoladas da espécie *Nuphar pumilum*, pertencente a esta família (YAMAHARA *et al.*, 1996).

Quanto à família Rutaceae, estudou-se a espécie *Galipea simplicifolia*, que apresentou atividade inibidora da linfoproliferação. Esta família é bastante estudada e relatada na literatura como sintetizadora de substâncias bioativas (WAGNER, 1977; ITO *et al.*, 1999) existindo relato de atividade de cumarinas isoladas da espécie *Citrus limon* inibindo a produção de óxido nítrico (MIYAKE *et al.*, 1999).

Quanto à família Caesalpiniaceae, avaliou-se o potencial bioativo das espécies *Hymenaea stigonocarpa*, *Chamaecrista brevicalyx*, *Senna obtusifolia* e *Bauhinia pulchella*, verificando-se atividade imunomoduladora para extratos das mesmas. Para o gênero *Bauhinia*, existe uma série de relatos de atividade farmacológica, podendo ser citada a atividade antiinflamatória do extrato da espécie *Bauhinia terapotensis* (SOSA *et al.*, 2002) e também do flavonóide isolado das raízes da espécie *B. variegata* (YADAVA & REDDY, 2003). Para o extrato metanólico da espécie *Bauhinia racemosa*, constatou-se a atividade antiulcerogênica (AKHTAR & AHMAD, 1995). Outras espécies desta família apresentaram atividades relacionadas à imunomodulação. As espécies *Senna cearensis* e a *Bauhinia pulchella* demonstraram atividade inibidora do crescimento do *T. cruzi* e da *L. amazonensis*.

Para realização dos ensaios, padronizou-se metodologias que oferecessem sensibilidade para avaliação das atividades e que fossem de fácil e rápida aplicação devido, sobretudo, à quantidade de amostras avaliadas.

O ensaio de citotoxicidade foi padronizado com base na viabilidade das células de baço após incubação com as drogas, estabelecida a partir da incorporação do nucleosídeo timidina tritiada e posterior contagem da radiação. Para a validação dessa técnica, comparou-se resultados obtidos por essa metodologia com resultados obtidos a partir das técnicas de contagem das células com azul de trypan e análise por citometria de fluxo

(marcação com iodeto de propídio). Com a comparação dos resultados, verificou-se que a sensibilidade do método pela incorporação da timidina e do iodeto de propídio foram as mais elevadas. Pela facilidade de utilização (placas de 96 poços), optou-se pelo ensaio de incorporação da ^3H -timidina.

Os ensaios de atividade antiparasitária foram realizados com base no metabolismo do MTT pelas enzimas mitocondriais dos parasitas para detecção de viabilidade. Esta metodologia, já descrita pela literatura (ABE & MATSUKI, 2000; MOSMANN, 1983), oferece rapidez na realização dos ensaios, sendo vantajoso dada a quantidade de amostras analisadas. As formas dos parasitas utilizadas inicialmente foram epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis*, devido à facilidade de crescimento e obtenção das mesmas. Alguns extratos apresentavam coloração, fato que pode interferir na absorbância das amostras. A correção foi sempre feita analisando-se as placas ao microscópio com confirmação através de contagem, na tentativa de observar a viabilidade dos parasitas e comparar posteriormente com os resultados obtidos através do método de metabolismo do MTT.

As frações obtidas a partir dos extratos das espécies *P. cincinnata* e *N. ampla* foram avaliadas e pôde-se identificar frações ativas. Especificamente no caso da *P. cincinnata*, existem várias frações que apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação elevada, o que pode ser atribuído à existência de mais de uma molécula com atividade imunomoduladora e com polaridades químicas diferentes, estando, portanto, em frações diferentes. Estas frações serão purificadas e as substâncias puras obtidas serão novamente avaliadas com o intuito de identificar a(s) molécula(s) responsável(is) pela atividade.

As frações ou substâncias puras com atividade serão reavaliadas em modelos experimentais *in vitro* mais específicos e sensíveis com o intuito de selecionar moléculas

com atividades específicas. As moléculas com atividade antiparasitária devem ser reavaliadas sobre formas sanguíneas ou intracelulares dos parasitas. Em relação à atividade imunomoduladora, serão realizados adicionalmente experimentos de linfoproliferação estimulada com antígeno e de reação mista linfocitária. As moléculas então selecionadas serão submetidas a avaliações em modelos experimentais para imunopatologias ou parasitoses *in vivo* e também a avaliações toxicológicas.

7 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos demonstram um potencial farmacológico da flora do semi-árido brasileiro, sendo grande parte dos extratos analisados bastante promissores dentro da perspectiva de busca de novas moléculas bioativas, já que vários dos extratos e frações ensaiados apresentam substâncias com atividade imunomoduladora (inibição da proliferação de linfócitos ativados e inibição da produção de óxido nítrico) e antiparasitária (contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*).
2. A metodologia utilizada ofereceu rapidez na realização dos ensaios, sendo vantajosa dada a quantidade de extratos e frações avaliadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; MATSUKI, N. 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neurosci. Res.**, **38**:325-329, 2000.
- AKHTAR, A.H.; AHMAD, K.U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. **J. Ethnopharmacol.**, **46**:1-6, 1995.
- AL-AWADI, F.M.; SRIKUMAR, T.S.; ANIM, J.T.; KHAN, I. Antiinflammatory effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats. **Nutrition**, **17**:391-396, 2001.
- ALVAR J, CANAVATE C, GUTIERREZ-SOLAR B, JIMENEZ M, LAGUNA F, LOPEZ-VELEZ R, MOLINA R, MORENO J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microbiol Rev.** **10**(2): 298-319, 1997.
- ASLAN, M. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. **Immunol. Res.**, **26**:107-118, 2002.
- BACCHI, C. J.; YARLETT, N. Polyamine metabolism as chemotherapeutic target in protozoan parasites. **Mini Rev. Med. Chem.**, **2**:553-563, 2002.
- BAYEUX, M.C.; FERNANDES, A.T.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **35**:1229-1232, 2002.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, **2**:907-915, 2001.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Institutos do Milênio – Uma nova perspectiva para a pesquisa e o desenvolvimento do Brasil**, 2002.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BUCKNER, F.S.; GRIFFIN, J.H.; WILSON, A.J.; VAN VOORHIS, W.C. Potent anti- *T. cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:1210-1215, 2001.

BURDMANN, E.A.; ANDOH, T.F.; YU, L.; BENNETT, W.M. Cyclosporine nephrotoxicity. **Semin Nephrol.**, **23**:465-476, 2003.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciê. Cult.**, **55**:37-39, 2003.

CALIXTO, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca. **Ciê. Hoje**, **21**:26-30, 1996.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, **72**:599-618, 2001.

CAZZULO, J.J. The major cysteine proteinase of *T. cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Pharm. Des.**, **7**:1143-1156, 2001.

CAZZULO, J.J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Top. Med. Chem.**, **2**:1261-1271, 2002.

CHAN, C.; YIN, H.; MCKIE, J.H.; FAIRLAMB, A.H.; DOUGLAS, K.T. Peptoid inhibition of trypanothione reductase as a potential antitrypanosomal and antileishmanial drug lead. **Amino Acids**, **22**:297-308, 2002.

CHAN-BACAB, M.J.; PENA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, **18**:674-688, 2001.

CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MESQUITA, A.A.; TAVARES, K.G. Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**:372-374, 1991.

COTRAN, R.S.; VINAY, K.; TUCKER, C.; et al. **Patologia Estrutural e Funcional - Robbins**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Antiasthmatic activity of the methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata*. **Phytother. Res.**, **17**:821-822, 2003.

DHAWAN, K.; KUMAR, R.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Correct Identification of *Passiflora incarnata* Linn., a promising herbal anxiolytic and sedative. **J. Med. Food.**, **4**:137-144, 2001a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. **Fitoterapia**, **72**:922-926, 2001b.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **J. Ethnopharmacol.**, **78**:165-170, 2001c.

DE MIRANDA, F.G.; VILAR, J.C.; ALVES, I.A.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacol.**, **1**:6, 2001.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical atlantic Forest. **Fitoterapia**, **73**:69-91, 2002.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of

activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141**:2407-2412, 1988.

DO SOCORRO, S.; ROSA, M. DO S.; MENDONCA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; DE ALMEIDA, R. I.; SOARES, R. M.; SOUTO-PADRON, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47**:1895-1901, 2003.

FARNSWORTH, N. R. Las plantas medicinales em la terapêutica. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, **107**:314-329, 1989.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; TOMMASINI, S.; CALABRO, M.L.; RAGUSA, S.; BARBERA, R.; RAPISARDA, A. Leaf extracts of some *Cordia* species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Farmaco**, **50**:245-256, 1995.

FRUTUOSO, V.S.; GURJAO, M.R.; CORDEIRO, R.S.; MARTINS, M.A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Med.**, **60**:21-25, 1994.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY R.M.; DE QUEIROZ L.P.; BARBOSA M.R.; DE BOCAGE NETA A.L.; FIGUEIREDO M.A. **Vegetação e Flora da Caatinga. Espécies endêmicas da caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, Centro Nordestino de Informação sobre Plantas, 2002.

ITO, C.; MASATAKA, I.; FURUKAWA, H.; TOKUDA, H.; OKUDA, Y.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, N.; NISHINO, H. Anti-tumor-promoting effects of 8-substituted 7-methoxycumarins on Epstein-Barr virus activation assay. **Cancer Lett.** **138**:87-92, 1999.

IWALEWA, E.O.; IWALEWA, O.J.; ADEBOYE, J.O. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. **J. Ethnopharmacol.**, **86**: 229-234, 2003.

KAUFMANN, H.E.S.; KABELITZ, D. **Immunology of infection. Methods in microbiology**. San Diego: Academic Press, 1998. v. 25.

KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O.; FERREIRA, D.; KOLODZIEJ, H. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages in vitro. **Z. Naturforsch.**, **56**:444-454, 2001.

KRENSKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. **The pharmacological basis of therapeutics**. Drugs used for immunomodulation. In: GOODMAN & GILMAN'S, 2001 & GILMAN'S. 20.ed. New York: McGraw Hill Companies, 2001.

LAPA, A.J. Importância da Farmacologia tradicional e novas descobertas no estudo das plantas medicinais. **Ars Cvrandi**, 46-52, 1995.

LEANDRO, C & CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **Int J Antimicrob Agents**. 22(3):352-7. 2003.

LEUSCHNER J. Anti-inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of a commercially available *Solidago gigantea* Herb. extract. **Arzneimittelforschung**, **45**:165-168, 1995.

LUQUE-ORTEGA, J.R.; RIVERO-LEZCANO, O.M.; CROFT, S.L.; RIVAS, L. In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:1121-1125, 2001.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F.; DE ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.**, **73**:335-340, 2000.

MENDONCA-FILHO, R. R.; RODRIGUES, I. A. Z.; ALVIANO, D. S.; SANTOS, A. L.; SOARES, R. M.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H.; ROSA, MDO. S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Res. Microbiol.**, **155**:136-143, 2004.

MIYAKE, Y.; MURAKAMI, A.; SUGIYAMAM Y.; ISOBE, M.; KOSHIMIZUM K.; OHIGASHI, H. Identification of coumarins from lemon fruit (*Citrus limon*) as inhibitors of in vitro tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation. **J. Agric. Food Chem.** **47**:3151-3157, 1999.

MOREL, C.M. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. **Embo Reports**, **4**:35-38, 2003.

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

MRAZEK, M.F., MOSSIALOS, E. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases. **Health Policy**, **61**:75-88, 2003.

NERGARD, C.S, DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; MALTERUD, K.E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B.S. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. **J. Ethnopharmacol.**, **91**:141-152, 2004.

OLIVA, M.L.; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.; ARAUJO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN. C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on

blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochim. Biophys. Acta**, **1477**:64-74, 2000.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DOS SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **65**:510-517, 2001.

PAVAO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1,95 Å resolution. **FEBS Lett.**, **520**:13-17, 2002.

PEREZ-VICTORIA, J.M.; PEREZ-VICTORIA, F.J.; PARODI-TALICE, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A.G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Alkyl-Lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:2468-2474, 2001.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, **25**:45-61, 2002.

PINTO, C.N.; DANTAS, A.P.; DE MOURA, K.C.; EMERY, F.S.; POLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M.C.; DE CASTRO, S.L.; PINTO, A.V. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. **Arzneimittelforschung**, **50**:1120-1128, 2000.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, **39**: 603-613, 2001.

ROEP, B.O. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, 46:305-321, 2003.

SANT'ANA, P.J.P. de. **Bioprospecção no Brasil – Contribuições para uma gestão ética**. Brasília: Paralelo 15, 2002.

SANTOS, A.F.; FERRAZ, P.A.; DE ABREU, F.C.; CHIARI, E.; GOULART, M.O.; SANT'ANA, A.E. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Planta Med.**, 67:92-93, 2001.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **J. Ethnopharmacol.**, 81:111-115, 2002.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, P.P.; PENNA, S.C. Pharmacological assay of *Cordia verbenaceae* III: oral and topic antiinflammatory activity and gastrotoxicity of crude leaf extract. **J. Ethnopharmacol.**, 31: 239-247, 1991.

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**. Porto Alegre: Universidade, 2001.

SOARES, M.B.P.; BELLINTANI, M.C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **Eur. J. Pharmacol.**, 459:107-112, 2003.

SOSA, S.; BRACA, A.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; MORELLI, I.; TUBARO, A. Topical anti-inflammatory activity of *Bauhinia tarapotensis* leaves. **Phytomedicine**, 9:646-653, 2002.

URBINA, J.A.; CONCPCION, J.L.; RANGEL, S.; VISBAL, G.; LIRA, R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *T. cruzi* and *L. mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **125**:35-45, 2002.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *T. cruzi* strains. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **21**:39-48, 2003.

WAGNER, H. Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. **Rev. Latinoamer. Quím.** **8**:16-25, 1977.

WENG, J.R.; TSAO, L.T.; YEN, M.H.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. **J. Nat. Prod.**, **66**:404-407, 2003.

YADAVA, R.N.; REDDY, V.M. Anti-inflammatory activity of a novel flavonol glycoside from the *Bauhinia variegata* Linn. **Nat. Prod. Res.**, **17**:165-169, 2003.

YAMAHARA, J.; SHIMODA, H.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Potent immunosuppressive principles, dimeric sesquiterpene thioalkaloids, isolated from nupharis rhizoma, the rhizoma of *Nuphar pumilum* (Nymphaeaceae): structure-requirement of nuphar-alkaloid for immunosuppressive activity. **Biol. Pharm. Bull.**, **19**:1241-1243, 1996.

ZHAO, W.; YE, Q.; TAN, X.; JIANG, H.; LI, X.; CHEN, K.; KINGHORN, A.D. Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. **J. Nat. Prod.**, **64**:1196-200, 2001.

ZUCCOTTO, F. Novel inhibitors of *T. cruzi* dihydrofolate reductase. **Eur. J. Med. Chem.**, **36**:395-405, 2001.

Endereços eletrônicos:

PROGRAMME for the surveillance and control of Leishmaniasis. Disponível em:
<<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishmaniasis.pdf>>. Acesso em: outubro/2003.

Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>>. Acesso em:
novembro/2003.

Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>>. Acesso em:
janeiro/2003.

CONHECIMENTO de diversidade de plantas terrestres do Brasil (MMA, 2000):

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/publica/mvalora/apresenta.html>>.
Acesso em: setembro/2003.

PLANTAS medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis (FUNBIO, 2004)

Disponível em :
<http://www.funbio.org.br/website/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1329&sid=17>.
Acesso em: janeiro/2004.

O semi-árido brasileiro:

Disponível em:
<http://www.asabrazil.org.br/Semiarido/semiarido.htm>
Acesso em: agosto/2004.