



UNIVALI
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARINA ELISA PHILIPPI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FLORA
CATARINENSE SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS**

Itajaí – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

MARINA ELISA PHILIPPI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FLORA
CATARINENSE SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Ednéia Casagrande Bueno

Itajaí, maio de 2008.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS DA FLORA
CATARINENSE SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS**
Marina Elisa Philippi

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

Ednéia Casagrande Bueno, Dra.
Orientador

Tânia Mari Bellé Bresolin, Dra.
Coordenador do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Dra. Ednéia Casagrande Bueno (UNIVALI)
Presidente

Dr. Alexandre Bella Cruz (UNIVALI)
Membro

Dra. Tânia Sílvia Fröde (UFSC)
Membro

Itajaí (SC), 28 de maio de 2008.

Dedicatória

Ao Criador, por permitir a realização deste trabalho;

Aos meus pais, Marina e Francisco Philippi pelo apoio e amor incondicional;

Ao meu noivo Roberto, pelo amor, incentivo e compreensão;

Aos meus irmãos Morgana e Júlio, pela constante presença em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em especial a minha orientadora, Prof. Dra. Ednéia Casagrande Bueno, pela amizade e exemplo de dedicação, competência e profissionalismo;

Aos Professores Dr. Rivaldo Niero, Dr. Valdir Cechinel Filho e Dra. Maique Weber Biavatti por cederem os extratos das plantas;

Aos colegas de grupo de pesquisa, Carol, Bruninha, Rodrigo e Fran, pelas longas jornadas de experimentos;

A Rosélia e Vânia pelo auxílio;

A Prof. Dra. Tânia Mari Bellé Bresolin pelas sugestões e apoio;

A toda equipe do Lamaro Laboratório e Laboratório Escola de Análises Clínicas, pela atenção, amizade e suporte para a realização do trabalho;

A todos meus amigos e amigas, por entenderem minha ausência;

Aos cunhados e cunhadas, pelo afeto e compreensão;

Aos meus avós Euclides e Anair Philippi, pelo carinho e exemplo de vida;

Ao meu Tio Cezar (*in memoriam*), que sempre me inspira a crescer e ser forte;

A Bruno Schmitt da Luz, Sueli Petry da Luz e Vó Ivone Vinanda Petry, agradeço o apoio e exemplo de perseverança.

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado,
mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

Albert Einstein

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE SEIS PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA CATARINENSE SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS *IN VITRO*

Marina Elisa Philippi

maio/2008.

Orientador: Ednéia Casagrande Bueno, Dra.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas.

Número de Páginas: 79.

Muitas são as plantas utilizadas na medicina popular, a maioria delas desconhecidas quanto ao efeito sobre o sistema imune. A identificação e caracterização de compostos naturais obtidos a partir de plantas e que apresentam atividade imunomodulatória vem sendo área de estudo em vasto desenvolvimento. O teste de linfoproliferação é um dos métodos usados para estudar o efeito imunomodulatório de extratos e compostos isolados de plantas medicinais e de derivados sintéticos. O presente estudo objetivou identificar o efeito dos extratos metanólicos de seis plantas da flora catarinense na proliferação *in vitro* de células mononucleares humanas na presença e na ausência de fitohemaglutinina (PHA) e *pokeweed mitogen* (PWM). As células mononucleares humanas obtidas de doadores saudáveis por centrifugação em gradiente de densidade (1×10^6 células/mL), PHA (5 $\mu\text{g/mL}$), PWM (5 $\mu\text{g/mL}$) e os extratos metanólicos de *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae*, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis* e *Vernonia scorpioides* (10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foram preparados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2% de bicarbonato de sódio a 10%, 1% de L-glutamina a 200 mM, 1% de HEPES a 10 mM e 110 mg/mL de piruvato de sódio. O teste de linfoproliferação foi realizado pela incubação da suspensão celular com o extrato da planta, isolada ou simultaneamente à PHA e ao PWM, em microplacas de 96 poços a 37°C e 5% CO₂. O período de incubação foi de 72 horas para ambos os mitógenos e ainda de 144 horas para PWM. A quantificação da proliferação celular foi realizada pelo ensaio de redução do azul de tetrazólio (MTT) com leitura a 540 nm. As células incubadas somente com DMEM foram empregadas como controle negativo de proliferação celular, enquanto que o controle positivo de proliferação celular foi constituído de células e PHA ou PWM. Os resultados foram expressos em porcentagem de crescimento e analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os resultados obtidos sugerem indução na proliferação linfócitos T, sem interferência na ativação dos linfócitos B, para os extratos metanólicos de *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* e *Matayba elaeagnoides*. O extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* demonstrou atividade imunoestimulatória 3 vezes maior que o extrato de *Calophyllum brasiliensis* e 1,5 vezes maior que extrato de *Matayba elaeagnoides*. O extrato metanólico de *Maytenus robusta* mostrou resultados relevantes somente quando incubado por 144 horas, com inibição da proliferação celular. Por fim, os resultados obtidos no teste de linfoproliferação sugerem que os extratos metanólicos de *Rubus imperialis* e *Vernonia scorpioides* não tem ação sobre a proliferação dos linfócitos T e B, pois não foram obtidos resultados com significância estatística nas condições de cultivo ensaiadas. Dentre as plantas estudadas, a *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* e *Matayba elaeagnoides* apresentaram resultados que justificam a continuidade dos estudos com a avaliação das frações e a identificação dos possíveis compostos responsáveis pelo efeito os linfócitos T.

Palavras-chave: *Calophyllum brasiliensis*, imunomodulação, *Ipomoea pes-caprae*, linfoblastogênese, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis*, sistema imune, atividade imunomodulatória.

EVALUATION OF THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS FROM FLORA OF SANTA CATARINA ON HUMAN MONONUCLEAR CELL PROLIFERATION

Marina Elisa Philippi

Supervisor: Ednéia Casagrande Bueno, Dr.

Area of Concentration: Natural Products and Bioactive Substances

Number of Pages: 79.

Many plants are used in popular medicine, most of which are unknown in relation to their effect on the immune system. The identification and characterization of natural compounds obtained from plants with immunomodulatory activity is a rapidly developing area of study. The lymphoproliferation assay is one of the methods used to study the immunomodulatory effect of extracts and compounds isolated from herbal plants, and also from synthetic derivatives. This study seeks to identify the effect of methanol extracts from six plants of the flora of Santa Catarina on the *in vitro* proliferation of human mononuclear cells, in the presence and absence of phytohemagglutinin (PHA) and pokeweed mitogen (PWM). The human mononuclear cells obtained from healthy donors by density gradient centrifugation (1×10^6 cells/mL), PHA (5 $\mu\text{g/mL}$), PWM (5 $\mu\text{g/mL}$) and the methanol extracts from *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae*, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis* and *Vernonia scorpioides* (10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) were prepared in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) culture medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% bicarbonate sodium at 10%, 1% L-glutamine at 200 mM, 1% 10 mM HEPES and 110 mg/mL of sodium pyruvate. The lymphoproliferation assay was carried out by incubation of cell suspension with the plant extract, alone or with PHA and PWM, in 96-well microplates, at 37 °C and 5% CO₂. The incubation period was 72 hours for both mitogens and 144 hours for the PWM. The quantification of the cell proliferation assay was performed by blue tetrazolium (MTT) reduction, with reading at 540 nm. The cells incubated only with DMEM were used as negative control for cell proliferation, while the positive control for cell proliferation consisted of cells and PHA or PWM. The results were expressed as percentage of growth and analyzed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The results suggest induction of T lymphocyte proliferation, without interference on B lymphocyte activation, for the extracts of *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* and *Matayba elaeagnoides*. The methanol extract of *Ipomoea pes-caprae* showed immunostimulatory activity that was three times higher than for the *Calophyllum brasiliensis* extract, and 1.5 times higher than for the *Matayba elaeagnoides* extract. The methanol extract of *Maytenus robusta* showed relevant results only when incubated for 144 hours, with inhibition of cell proliferation. Finally, the results obtained in the lymphoproliferation assay suggest that the methanol *Rubus imperialis* and *Vernonia scorpioides* extracts have no action on T and B lymphocyte proliferation, as the results showed no statistical significance in all conditions for cellular growth studied. Of the plants studied, *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* and *Matayba elaeagnoides* showed results that justify the continuation of studies, evaluating fractions and identifying potential compounds responsible for the effect on T lymphocytes.

Key-words: *Calophyllum brasiliensis*, immune response, immune system, immunomodulation, *Ipomoea pes-caprae*, lymphoblastogenesis, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis*, *Vernonia scorpioides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto ilustrativa <i>Calophyllum brasiliensis</i>	19
Figura 2	Fotos ilustrativas <i>Ipomoea pes-caprae</i>	20
Figura 3	Foto ilustrativa <i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.....	21
Figura 4	Foto ilustrativa <i>Maytenus robusta</i>	22
Figura 5	Foto ilustrativa <i>Rubus imperialis</i>	24
Figura 6	Fotos ilustrativas <i>Vernonia scorpioides</i>	26
Figura 7	Proliferação das células mononucleares humanas (1×10^6 células/mL) frente ao estímulo de <i>pokeweed mitogen</i> (5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação a 37 °C com 5% de CO ₂ durante 72 horas (A) e 144 horas (B).....	39
Figura 8	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 $\mu\text{g/mL}$) e <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Calophyllum brasiliensis</i>	41
Figura 9	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Calophyllum brasiliensis</i>	42
Figura 10	Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de <i>Calophyllum brasiliensis</i> incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao <i>pokeweed mitogen</i> a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO ₂ durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).....	43
Figura 11	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 $\mu\text{g/mL}$) e <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Ipomoea pes-caprae</i>	47
Figura 12	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Ipomoea pes-caprae</i>	48
Figura 13	Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de <i>Ipomoea pes-caprae</i> incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao <i>pokeweed mitogen</i> a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO ₂ durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).....	49
Figura 14	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 $\mu\text{g/mL}$) e <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Matayba elaeagnoides</i>	52
Figura 15	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em	

	percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Matayba elaeagnoides</i>	53
Figura 16	Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de <i>Matayba elaeagnoides</i> incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 µg/mL (B) e ao <i>pokeweed mitogen</i> a 5 µg/mL (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO ₂ durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).....	54
Figura 17	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Maytenus robusta</i>	56
Figura 18	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Maytenus robusta</i> .	57
Figura 19	Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de <i>Maytenus robusta</i> incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 µg/mL (B) e ao <i>pokeweed mitogen</i> a 5 µg/mL (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO ₂ durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).....	58
Figura 20	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Rubus imperialis</i>	60
Figura 21	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Rubus imperialis</i> ...	61
Figura 22	Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de <i>Rubus imperialis</i> incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 µg/mL (B) e ao <i>pokeweed mitogen</i> a 5 µg/mL (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO ₂ durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).....	62
Figura 23	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Vernonia scorpioides</i>	64
Figura 24	Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico <i>pokeweed mitogen</i> (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO ₂ frente a extrato metanólico <i>Vernonia scorpioides</i>	65
Figura 25	Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de <i>Vernonia scorpioides</i> incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 µg/mL (B) e ao <i>pokeweed mitogen</i> a 5 µg/mL (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO ₂ durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

PBMC	- Células mononucleares humanas
PHA	- Fitohemaglutinina
PWM	- Pokeweed mitógeno
DMEM	- Dulbelccos's Modified Eagles Médium
MTT	- Azul de tetrazólio
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
LPS	- Lipopolissacáride
ConA	- Concanavalina A
PPD	- Proteína derivada purificada
NIQFAR	- Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas
LEAC	- Laboratório Escola de Análises Clínicas
DMSO	- Dimetilsulfoxido
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
Dot	- Densidade óptica do teste
Doc	- Densidade óptica do controle negativo de proliferação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Plantas medicinais.....	16
3.2 Sistema imune.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Tipo de estudo.....	33
4.2 Local de estudo.....	33
4.3 População/amostra.....	33
4.4 Coleta de dados ou descrição dos procedimentos experimentais.....	34
4.5 Análise e discussão dos dados.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 <i>Calophyllum Brasiliensis</i>	40
5.2 <i>Ipomoea pes-caprae</i>	45
5.3 <i>Matayba elaeagnoides</i>	50
5.4 <i>Maytenus robusta</i>	55
5.5 <i>Rubus imperialis</i>	59
5.6 <i>Vernonia scorpioides</i>	63
6 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas na medicina popular tem direcionado os estudos a fim de confirmar cientificamente os efeitos observados. Em geral esta comprovação tem sido eficaz, principalmente quando considerado o envolvimento de produtos naturais no desenvolvimento de cerca 44% de todos os novos fármacos apresentados ao consumidor (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

O efeito de produtos obtidos de plantas medicinais pode ser direcionado a diferentes alvos e com os mais diversos objetivos. A utilização de plantas medicinais com efeito sobre o sistema imunológico visa estimulá-lo e adequar seu funcionamento (BREKHMANN; DURDYMOV, 1969). Nos mamíferos, o sistema imune desempenha papel fundamental na defesa contra infecções, e a integridade e eficiência deste sistema são importantes durante intervenções para o tratamento de diversas doenças (STITES; TERR, 1992; ISHIZUKA et al., 1995).

Vários grupos de pesquisadores ligados à produção e desenvolvimento de fitofármacos têm como foco o estudo do efeito das plantas medicinais sobre a resposta imune *in vitro* e/ou *in vivo*. Um dos modelos empregados nos estudos *in vitro* avalia linfócitos estimulados com compostos que promovem a proliferação destas células, como os mitógenos fitohemaglutinina (PHA) e *pokeweed mitogen* (PWM). A aplicação de extrato, frações e compostos obtidos de plantas neste ensaio permite identificar o efeito sobre a resposta proliferativa dos linfócitos (UPADHYAY et al., 1990; SOUZA-FAGUNDES et al., 2002). Como resultado, é possível inferir que o extrato, fração ou composto testado promove imunomodulação, especificamente na resposta dos linfócitos (BREKHMANN; DURDYMOV, 1969).

Ambas as situações, estímulo e supressão da proliferação linfocitária, têm interesse clínico. A imunoestimulação tem fundamental importância no restabelecimento da capacidade do organismo em responder às doenças oportunistas, como em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida. A imunossupressão, por sua vez, apresenta grande utilidade em casos específicos, como na terapia em transplantados evitando rejeição ao enxerto (PATWARDHAN et al., 1990; MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001).

O presente trabalho representa um estudo pioneiro quanto à ação dos extratos metanólicos obtidos de seis plantas medicinais da flora catarinense - *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae*, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis* e *Vernonia scorpioides*, na proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com PHA e PWM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos extratos metanólicos obtidos de plantas da flora catarinense na proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito dos extratos metanólicos de *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae*, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis* e *Vernonia scorpioides* na proliferação *in vitro* de células mononucleares humanas, estimuladas com PHA e PWM;
- Verificar o efeito dos extratos metanólicos de *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae*, *Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta*, *Rubus imperialis* e *Vernonia scorpioides* na proliferação de células mononucleares humanas *in vitro*, na ausência dos mitógenos;
- Avaliar o efeito imunomodulador dos extratos destas plantas inferindo a população celular alvo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

Atualmente apenas 30 a 40% das 2.000 doenças agudas e crônicas registradas são curáveis, outras tantas podem ser tratadas com vistas a minimizar os sintomas e algumas doenças ainda não têm tratamento preconizado. Assim, há uma real necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos tratamentos, altamente eficientes e para os quais se espera que a fitoterapia possa contribuir. Somado a isso, ainda há de se considerar a imensa reserva de cerca de 300.000 espécies de plantas, das quais apenas 30% foram investigadas (WAGNER, 2007).

Os produtos naturais desempenham um importante papel no processo de descoberta de fármacos. Na última década, os produtos naturais foram responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna (CALIXTO, 2001). Segundo Lozoya (1997), aproximadamente 25% dos fármacos empregados nos países industrializados advém, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores.

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina popular brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos, de fácil acesso à população, mas que devem ser empregados de forma segura e racional (SIMÕES, 2000). Entretanto, algumas patologias como AIDS, hepatite C, processos inflamatórios e dolorosos, doenças auto-imunes, entre outras, apesar da grande quantidade de fármacos disponíveis no mercado ainda não possuem tratamento adequado. Por este motivo, a comunidade científica tem buscado obter moléculas ativas a partir de fontes naturais, sendo que algumas classes de metabólitos secundários já têm demonstrado atividades satisfatórias *in vitro* e *in vivo* (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; CECHINEL FILHO, 2000; CALIXTO, 2001; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

As plantas são reconhecidas pela sua habilidade em produzir uma grande quantidade de metabólitos secundários. Estes metabólitos são biossintetizados com

diferentes propósitos, incluindo regulação do crescimento, interações inter e intraespecíficas, defesa contra predadores e infecções. Muitos destes metabólitos demonstraram atividades biológicas e farmacológicas de interesse clínico, sendo utilizados como ponto de partida para o desenvolvimento da medicina moderna (CRAGG et al., 1999; VERPOORTE, 2000). O desenvolvimento de novos métodos analíticos de alta tecnologia tem permitido isolar os componentes constituintes de plantas, mesmo que estes estejam presentes em quantidades extremamente baixas, facilitando a pesquisa e o estudo destes componentes (WAGNER, 2007).

A busca de novas substâncias terapêuticas em produtos naturais apresenta vantagens, uma vez que estes produtos fornecem fármacos que por via sintética seriam de difícil obtenção e de custo elevado. Os produtos naturais podem também ser utilizados como estrutura básica na obtenção de novos medicamentos, e com pequenas modificações estruturais apresentarem maior atividade e/ou menor toxicidade. Ainda, os produtos naturais podem servir de modelo para a obtenção de medicamentos sintéticos com atividade biológica semelhante (ROBBERS; SPEEDIE; WARRS, 1997).

A suplementação de ensaios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* com modelos de testes biológicos moleculares modernos ocasionou grande progresso à área de desenvolvimento de fármacos. Estes modelos permitem a triagem molecular de extratos e compostos isolados de plantas, com a identificação dos mecanismos de ação e a potência dos mesmos (WAGNER, 2007).

Usualmente, os estudos envolvem ensaios de atividade biológica na triagem dos extratos brutos obtidos das plantas medicinais, para no seguimento dos estudos avaliar as frações e os compostos isolados responsáveis pela atividade observada. Após a seleção das substâncias puras ativas, estas são avaliadas em ensaios mais específicos com a análise do mecanismo de ação biológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Na escolha da planta a ser estudada, vários aspectos devem ser considerados, sendo as informações da medicina popular um dos principais aspectos a ser observado (CECHINEL FLHO; YUNES, 2001). A disponibilidade da planta, extratos e frações, os estudos científicos prévios, entre outros, também são fatores a serem observados.

As plantas medicinais da flora catarinense apresentam uma grande diversidade de espécies. Uma pequena amostragem destas espécies tem sido estudada por grupo de pesquisadores do estado de Santa Catarina, o NIQFAR

(Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas), ligado ao desenvolvimento de fitofármacos no que tange a fitoquímica e atividade farmacológica de plantas da flora catarinense (KROGH et al., 1999; NIERO et al., 1999; SOUZA et al., 2000; NIERO et al., 2001; SILVA et al., 2001; LEITE et al., 2002; NIERO et al., 2002; ITO et al., 2003; ISAIAS et al., 2004; DALAZEN et al., 2005; EMENDORFER et al., 2005; GASPAROTTO et al., 2005; PAGNO et al., 2006; SOUZA, 2006; BUSKÜHL, 2007). Dentre estas plantas já estudadas foram selecionadas, para o presente estudo, seis plantas medicinais cujos dados referentes à atividade biológica até o presente momento não incluem a avaliação quanto à imunomodulação sobre a proliferação linfocitária.

Calophyllum brasiliensis

O gênero *Calophyllum*, da família Clusiaceae (Guttiferae), consiste em 180 espécies com uma distribuição pantropical (PENNINGTON; SARUKAHAN, 1998). A *Calophyllum brasiliensis* é popularmente conhecida como jacareúba e guanandi, de ampla distribuição do Brasil ao México, com uso medicinal popular associado ao tratamento de úlcera, inflamação e dor. As atividades anti-secretória e citoprotetora dos compostos produzidos por esta espécie foram confirmadas em estudos farmacológicos (OLIVEIRA et al., 1999; SARTORI et al., 1999).

Uma extensa investigação do gênero *Calophyllum* resultou no isolamento de uma grande variedade de compostos, incluindo xantonas, cumarinas, flavonoídes, chalconas, benzofenonas e triterpenos (ITO et al., 1999). O estudo fitoquímico de *Calophyllum brasiliensis* mostrou a presença de triterpenos e xantonas isolados da fração clorofórmio, respectivamente friedelin e 1,5 dihidroxixantona. Ambas as substâncias exibiram consideráveis propriedades antinociceptivas em comparação com o ácido acetil salicílico e acetaminofeno (ISAIAS et al., 2004). As frações hexano e acetato de etila obtidos a partir da folha da *Calophyllum brasiliensis*, bem como compostos isolados da fração acetato de etila – quercitina, ácido gálico, ácido protocatético, hiperosideo e amantoflavona, apresentaram efeito analgésico similar aos fármacos de referência (SILVA et al., 2001).

Estudos fitoquímicos do caule e da resina desta espécie revelaram a presença de diversas substâncias químicas, com atividade antimicrobiana para algumas cumarinas (GASPAROTTO et al., 2005). Outro estudo com *Calophyllum*

brasiliensis mostrou atividade antibacteriana seletiva contra bactérias gram positivas e contra alguns tipos de fungos (PRETTO, 2005). Os ácidos isolados da casca do *Calophyllum brasiliensis* mostraram de moderada a grande atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis*, sem apresentar atividade citotóxica (COTTIGLIA et al., 2004). As xantonas desta espécie mostraram também atividade tripanossomicida (ABE et al., 2004).

A maioria das frações hexânicas obtidas de folhas do *Calophyllum brasiliensis* mostrou inibição da atividade da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1, duas delas com inibição superior a 70% e ambas sem toxicidade para a linhagem linfocitária humana MT2 (HUERTA-REYES et al., 2004). O composto GUT-70, isolado das cascas da árvore de *Calophyllum brasiliensis*, coletado no Brasil, inibiu significativamente o crescimento de seis linhagens de células leucêmicas humanas (KIMURA et al., 2005). Contrariamente, a fração hexânica de *Calophyllum brasiliensis* não mostrou influência sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos, mas apresentou aumento da hemopoiese (BREHMER, 2005).



Figura 1. Foto ilustrativa *Calophyllum brasiliensis*.

Fonte: WIKIMEDIA FOUNDATION, 2008.

Ipomoea pes-caprae

As plantas pertencentes ao gênero *Ipomoea*, da família Convolvulaceae, consistem em mais de 200 espécies amplamente distribuídas nos países tropicais e subtropicais (LOCHER et al., 1995; SOUZA et al., 1998). A *Ipomoea pes-caprae*, conhecida como salsa-da-praia ou batata-da-praia, tem sido utilizada popularmente em vários países para inflamação, cólica, desordens diuréticas, gonorréia, processos dolorosos, entre outros (PONGPRAYOON et al., 1991; PONGPRAYOON et al., 1992; LOCHER et al., 1995; SOUZA et al., 1998).

Estudos confirmam o uso popular da *Ipomoea pes-caprae* contra a dor associada à reação local após o contato com águas-marinhas venenosas (PONGPRAYOON; BOHLIN; WASUWAT, 1991). O extrato metanólico da espécie revelou também potentes e significantes propriedades antinociceptivas associadas às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com ação analgésica equipotente a algumas drogas analgésicas de referência. Esta ação analgésica sugere inibição na síntese de prostaglandinas pela presença de esteróides, terpenóides, alcalóides e flavonóides no extrato (SOUZA et al., 2000).

Os componentes isoprenóides isolados do extrato bruto desta espécie mostraram inibição das contrações da musculatura lisa do intestino em modelos experimentais e de potência semelhante à papaverina, comprovando o uso popular como antiespasmódico (KROGH et al., 1999). O extrato bruto desta espécie mostrou ainda favorecer o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos mas, em contrapartida, estimulou a hematopoese (BREHMER, 2005).



Figura 2. Fotos ilustrativas *Ipomoea pes-caprae*.

Fonte: BENADIK, 2007 (A,B), SEGALLEN, 2007 (C).

Matayba elaeagnoides

A *Matayba elaeagnoides* Radlk, da família Sapindaceae, é conhecida popularmente por camboatá, camboatã, cragoatã-branco, cuvantã, craguatã, pau-de-pombo, pau-crioulo e camboatá-branco. A distribuição da planta ocorre nos estados de Minas Gerais e São Paulo até o Rio Grande do Sul (LOPEZ et al., 1987; LORENZI, 2000). A espécie é muito empregada na construção civil, como caibros, vigas, ripas, tabuado em geral para obras internas, e para lenha e carvão. Os frutos são avidamente consumidos por várias espécies de pássaros e a árvore é indicada para a composição de reflorestamentos e paisagismo (LORENZI, 2000).

A *Matayba elaeagnoides* Radlk é popularmente utilizada no tratamento de inflamações, na analgesia e no combate ao câncer hepático (LORENZI, 2000; RIBEIRO, 2004). Estudo realizado com extratos oriundos das cascas desta espécie demonstrou a presença de vários compostos químicos, como cumarinas, lupeol, sitosterol, escopoletina, umbeliferona e betulina. Vários extratos e frações avaliados apresentaram atividade antinociceptiva e antimicrobiana, somado ainda à atividade antifúngica da fração clorofórmio e à ação antiparasitária da fração hexano (SOUZA, 2006).



Figura 3. Foto ilustrativa *Matayba elaeagnoides* Radlk.

Fonte: BACKES; IRGANG, 2002.

Maytenus robusta

Pertencente a família Celastraceae, a *Maytenus robusta* é pertencente à mesma família da *Maytenus ilicifolia*, que é nativa do sul do Brasil, conhecida popularmente como “espinheira santa” ou “cancerosa” e usada na medicina popular como agente anti-ulcerogênico. A maior ocorrência da *Maytenus robusta* é em regiões de clima ameno, de Minas Gerais ao Rio Grande de Sul, sendo mais abundante nas matas do Sul (ROSE, 1997).

A *Maytenus robusta*, muito bem adaptada ao sul do Brasil, tem sido utilizada como planta alternativa da *Maytenus ilicifolia*, em virtude desta também apresentar terpenoides, flavonóides e o triterpeno friedelina na sua composição e ao fato da *Maytenus ilicifolia* estar em risco de extinção no Brasil devido ao crescente uso como planta medicinal (NIERO et al., 2001). Entretanto, não há relatos na literatura acerca da atividade biológica desta espécie.

A composição química da *Maytenus ilicifolia* revelou a presença de triterpenos e compostos fenólicos com importantes propriedades biológicas, como atividade citotóxica, antibacteriana e anti-ulcerogênica (CARLINI, 1988; OLIVEIRA et al., 1991; SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; ZHU et al., 1998). O triterpeno friedelina parece ser o principal componente responsável pela ação anti-ulcerogênica e contra gastrite desta planta (PEREIRA et al., 1992).



Figura 4. Foto ilustrativa *Maytenus robusta*.

Fonte: arquivos do NIQFAR.

Rubus imperialis

A *Rubus imperialis*, conhecida como amora-branca, amora-do-mato ou amora-brava (CECHINEL FILHO, 2000), é pertence à família Rosaceae. As plantas desta família estão presentes em muitas partes do mundo, principalmente nas regiões temperadas, compreendendo aproximadamente 100 gêneros e mais de 700 espécies (JORGE; MARKMAN, 1993; PATEL; ROJAS-VERA; DACKER, 2004). A *Rubus imperialis*, bem como outras espécies, tem sido empregada em comunidades rurais para diabetes e outras enfermidades, algumas relacionadas à dor (ALONSO; CADAVID; CALLEJA, 1980; ZONTA; RUEDIGER, 1996; CECHINEL FILHO, 2000).

O isolamento do triterpeno niga-ichigoside F1 com atividade analgésica em ratos mostrou que esta espécie tem perspectivas terapêuticas (LOCHER et al., 1996). A análise dos constituintes químicos encontrados na fração acetato de etila de partes aéreas de *Rubus imperialis* mostrou presença de triterpenos niga-ichigosídeo, ácido tormêntico e ácido 23-hidroxi-tormentico, alguns destes triterpenos com atividade analgésica (NIERO et al., 1999). Em outro estudo do mesmo grupo foi demonstrado que estes triperpenos apresentam atividade analgésica maior que duas drogas de referência, a aspirina e o paracetamol (NIERO et al., 2002).

A fração acetato de etila das raízes da planta apresentou atividade no bioensaio de citotoxicidade frente à *Artemia salina*, enquanto que o niga-ichigosídeo F1 desta fração não apresentou esta ação sobre o microcrustáceo. Este achado sugeriu a existência de outros compostos responsáveis pela atividade citotóxica, ou ainda, que há sinergismo entre mais de um princípio ativo (KANEGUSUKU, 2001). Estudos químicos e farmacológicos confirmaram que algumas espécies desta planta produzem princípios ativos que exercem atividade hipoglicemiante, efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas, além de atividades anti-alérgicas contra rinite alérgica, dermatite atópica e asma (SWANSTON-FLATT et al., 1990).



Figura 5. Foto ilustrativa *Rubus imperialis*.

Fonte: arquivos do NIQFAR.

Vernonia scorpioides

A *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers., pertencente à família Asteraceae, é conhecida vulgarmente por erva-de-preá, erva-de-São-Simão, capichingui, capichingui-de-bicho, piracá, enxuga e noqueira. A espécie é muito comum no Brasil e tida como erva daninha freqüente em pastagens, terrenos baldios e beira de estradas (CABRERA, KLEIN; 1980; TOIGO et al., 2004).

Algumas das espécies do gênero *Vernonia* são tradicionalmente usadas para tratar desordens gastrointestinais, como as folhas frescas maceradas de *V. condensata*, conhecida popularmente como fel-de-bugre, fel-de-índio ou alumã. O uso tópico do extrato hidroalcoólico das folhas frescas desta espécie é amplamente empregado pela população para tratar uma variedade de afecções cutâneas, incluindo úlceras crônicas (MONTEIRO et al., 2001).

Várias espécies de *Vernonia* têm demonstrado atividades biológicas em diferentes estudos, como antiinflamatórias (IWALEWA; IWALEWA; ADEBOYE, 2003; MAZUMDER et al., 2003), antipirética (GUPTA et al., 2003), anticâncer (HOWARD; GARRA; ISHIDA, 2003; IZEVBIGIE; BRYANT; WALKER, 2004; LAMBERTINI et al., 2004), antimalárica (ABOSI; RASEROKA, 2003) e antimicrobiana (MONTEIRO et al., 2001; BRASILEIRO et al., 2006).

O gênero *Vernonia* produz lactonas sesquiterpênicas características, metabólitos típicos da família Asteraceae. Estas lactonas apresentam várias

atividades biológicas já descritas na literatura, como fungistáticas (KRISHNA KUMARI et al., 2003), relaxantes do músculo liso (CAMPOS et al., 2003) e citotóxicas (KUO et al., 2003). Outras substâncias isoladas de *Vernonia* são flavonóides (HUANG; DING; LIU, 2003), esteróides (TCHINDA et al., 2003) e polissacarídeos (NERGARD et al., 2004).

A *Vernonia scorpioides* teve comprovada atividade fungicida (FREIRE et al., 1996) e leve atividade cicatrizante (LEITE et al., 2002; DALAZEN et al., 2005). Estudos comprovam também que a fração diclorometano da *Vernonia scorpioides* inibe totalmente o desenvolvimento de tumor ascítico de Ehrlich quando em contato direto com as células tumorais. Contrariamente, no tumor sólido não houve influência da via de administração oral ou intraperitoneal no desenvolvimento do tumor, sugerindo ações enzimáticas que desativem a via sistêmica. A fração ainda aumentou o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal, propriedade que pode justificar a exacerbação desta atividade citotóxica e demonstrar o potencial efeito antitumoral (PAGNO et al., 2006). Recentemente foi relatada a atividade citotóxica das lactonas sesquiterpênicas e do poliacetileno obtido desta espécie sobre células tumorais Hela, com indução de apoptose e aumento na expressão de caspase 3 deste último composto (BUSKÜHL, 2007).

Todas as seis plantas descritas acima não apresentam dados na literatura quanto à atividade biológica relacionada à resposta imune adquirida. Assim, o presente estudo permitirá igualmente mapear quais as plantas com ação sobre a resposta proliferativa de células mononucleares humanas mais promissoras, para o desenvolvimento de estudos seqüenciais envolvendo marcadores moleculares relacionados à resposta imune adaptativa.



Figura 6. Fotos ilustrativas *Vernonia scorpioides*

Fonte: BITTRICH; AMARAL, 2004.

A grande diversidade da flora, principalmente a brasileira, pode ser melhor estudada e explorada, tanto no descobrimento de novas substâncias com potencial terapêutico quanto na elucidação de inúmeras substâncias que são utilizadas pela população sem a comprovação das propriedades, efeitos farmacológicos e efeitos tóxicos. A pesquisa das propriedades imunomodulatórias de plantas medicinais, bem como dos mecanismos de ação envolvidos, poderá possibilitar perspectivas plausíveis no que tange a imunoterapia e proporcionar novos conceitos acerca do efeito sobre a imunidade (TAVARES, 1996; PLAEGER, 2003).

3.2 Sistema Imune

O meio ambiente contém uma grande variedade de agentes infecciosos que podem causar doença e óbito do hospedeiro. A Imunologia é o estudo dos mecanismos fisiológicos que os seres humanos e outros animais usam na defesa contra a invasão por estes agentes infecciosos (PARHAM, 2001). O termo imunidade é derivado da palavra em latim *immunitas*, que se refere à isenção de vários deveres cívicos e de processos legais destinada aos senadores romanos durante o mandato. Historicamente, imunidade significa proteção contra doença e,

mais especificamente, contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune, enquanto que a resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas no organismo é chamada resposta imune (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

A resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento de um agente agressor estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação com a finalidade de eliminá-lo do organismo. O organismo responde à invasão por um agente estranho de duas maneiras distintas e correlacionadas, a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. Os mecanismos envolvidos na imunidade inata iniciam o processo de defesa, estando sempre presentes e sendo rapidamente ativados, embora nem sempre com capacidade de eliminar o agente estranho. A eliminação do agente e do processo infeccioso é realizada pelo desenvolvimento e ação da resposta imune adaptativa. As principais características desta resposta são a especificidade ao agente agressor e a memória imunológica, esta última propiciando resposta de defesa mais eficiente, rápida e intensa quando no segundo contato com o agente (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

A imunidade inata, ou inespecífica, é conferida por elementos que constituem barreiras efetivas contra a invasão por vários microrganismos, como a pele, membranas mucosas, secreções, reflexos de tosse e substâncias químicas. Outros componentes são também característicos desta imunidade, como diversos mediadores farmacológicos e proteínas séricas como complemento e interferons, além das células conhecidas como monócitos, linfócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Todos os elementos que constituem a resposta imune inata afetam o agente estranho e aumentam a eficiência das reações do hospedeiro contra o mesmo, especialmente pela interação no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (PAUL, 2003).

A imunidade adaptativa, ou específica, é mais especializada do que a resposta inata. O contato inicial com o agente desencadeia uma série de eventos que levam à ativação das células desta resposta imune, os linfócitos T e B. Estas células são produzidas na medula óssea a partir da célula progenitora *stem cell*. A diferenciação dos linfócitos B ocorre na própria medula óssea, enquanto que os linfócitos T amadurecem no timo, diferenciando-se em linfócitos T auxiliares, que expressam a proteína CD4 na membrana celular, ou em linfócitos T citotóxicos, que expressam CD8 (HENRY, 1999; PARHAM, 2001).

Os linfócitos reconhecem o antígeno através de proteínas presentes na membrana celular, que no linfócito B são imunoglobulinas e no linfócito T são os receptores de células T. Os linfócitos B podem reconhecer qualquer tipo de antígeno, inclusive na forma nativa, sofrendo mitoses sucessivas quando ativados. Posteriormente ao ciclo de mitoses estes linfócitos B se diferenciam em plasmócitos, que são as células secretoras dos anticorpos efetores da resposta imune humoral. A interação química altamente específica entre os anticorpos, ou imunoglobulinas, e o agente estranho, têm por função neutralizar a atividade do agente e desencadear mecanismos de defesa que culminem na eliminação do mesmo (REEVES; TODD, 2000; ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Os linfócitos T, contrariamente aos linfócitos B, reconhecem apenas a seqüência primária de pequenos peptídeos derivados de antígenos protéicos. Para que o reconhecimento ocorra é necessário que estes peptídeos estejam ligados a determinadas moléculas expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos, as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os antígenos protéicos extracelulares são fagocitados pelas células apresentadoras de antígenos, processados até pequenos peptídeos pela ação de proteases dentro de vesículas endocíticas, e então ligados às moléculas do MHC classe II e expressos na membrana celular para que possam ser reconhecidos pelo linfócito T CD4. Contrariamente, os antígenos protéicos intracelulares sintetizados no citosol são processados em pequenos peptídeos pelo proteassoma, transportados para o retículo endoplasmático, e então ligados às moléculas do MHC de classe I e expressos na superfície da célula para que possam ser reconhecido pelo linfócito T CD8 (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

Os linfócitos T, através do receptor de célula T, interagem com o peptídeo apresentado pelo MCH na superfície da célula apresentadora de antígeno, desencadeando o processo de ativação celular quando o agente é reconhecido como estranho. Este processo promove divisões mitóticas sucessivas do linfócito T, formando um repertório de células responsáveis pela resposta imune celular. A maioria das células que expressam CD4 tem ação auxiliar na resposta imune através da produção de citocinas, enquanto que as células que expressam CD8 têm ação citolítica e são capazes de destruir células que carreguem na superfície antígenos estranhos complexados ao MHC (HENRY, 1999; PARHAM, 2001).

Toda atividade do sistema imune pode ser estimulada ou suprimida, no processo conhecido como imunomodulação. Este processo altera o sistema imune e interfere nas funções fisiológicas do mesmo, apresentando como resultado a exacerbação ou a supressão da resposta imune inata e/ou adaptativa. A imunoestimulação em indivíduos portadores de imunodeficiência, como a AIDS, tem fundamental importância no restabelecimento da capacidade do organismo em responder às doenças oportunistas. Contrariamente, a imunossupressão implica principalmente na diminuição da resposta imune, que embora reduza a resistência a infecções tem grande utilidade em casos específicos, como na terapia em transplantados evitando a rejeição ao enxerto (PATWARDHAN et al., 1990; MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001).

Desde a década de 80, considerando a necessidade de controle e equilíbrio entre as atividades estimulatórias e supressoras do sistema imune, a identificação e caracterização de compostos naturais com atividade imunomodulatória tem se apresentado como área de interesse científico (PHILLIPSON, 2003). As metodologias laboratoriais que permitem a avaliação da resposta imune se desenvolveram gradativamente a partir das duas últimas décadas, e atualmente têm apresentado padronizações que podem levar ao emprego mais amplo e efetivo destes métodos de estudo (HENRY, 1999). Assim, o efeito de extratos, frações e compostos obtidos de plantas sobre a atividade imunomodulatória tem sido foco de estudo de pesquisadores da área de fitofármacos, e pode ser determinada tanto em modelos *in vivo* quanto em modelos *in vitro* (PANDIMA DEVI et al., 2003).

O teste de proliferação de linfócitos, também conhecido como linfoblastogênese ou transformação blástica, é um ensaio *in vitro* que permite verificar a estimulação ou supressão dos linfócitos frente aos compostos naturais, simultaneamente ou não aos mitógenos (PANDIMA DEVI et al., 2003; PAUL, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2007; ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007). Os mitógenos são substâncias obtidas geralmente de plantas, conhecidas coletivamente como lectinas, e que possuem a habilidade de induzir a ativação e conseqüente proliferação dos linfócitos T e/ou B de maneira similar aos antígenos específicos. Estas lectinas se ligam aos receptores da superfície celular suscitando um sinal intracelular semelhante ao antígeno, e que é interpretado pela célula como indicador para realização das etapas do ciclo celular a fim de realizar a mitose. Ao contrário do antígeno, o mitógeno estimula uma grande proporção de linfócitos

independentemente da especificidade antigênica, uma vez que não se liga ao receptor antígeno específico da célula, como faz o antígeno (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

Um dos mitógenos frequentemente utilizado é uma lectina obtida de *Phaseolus vulgaris*, a PHA, que é uma proteína vegetal polimérica de 140.000 kDa empregada na ativação dos linfócitos T humanos e murinos. Outro mitógeno, o PWM, é uma proteína vegetal de 32.000 kDa extraído da *Phytolacca americana* e usualmente utilizado para ativar linfócitos B dependentes de linfócitos T, também humanos e murinos. Ainda há outros estimuladores amplamente utilizados, como lipopolissacarídeo (LPS), concanavalina A (ConA) ou antígenos específicos obtidos de diferentes agentes agressores. O período de incubação necessário para que os mitógenos interajam com as células e exerçam a atividade proliferativa no teste de linfoproliferação varia de acordo com o mitógeno empregado, como 72 horas para a PHA e 144 horas para o PWM (MYERS, 1995; PANDIMA DEVI et al., 2003; PAUL, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2007; ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

As células utilizadas no ensaio são obtidas a partir do isolamento de populações mononucleares do sangue periférico humano, assim como células esplênicas de camundongos, representando respectivamente o modelo de estudo humano e murino. No modelo murino é possível ainda avaliar as células obtidas de animais que receberam previamente a suplementação dietética com o composto natural foco do estudo (DENIZOT; LANG, 1986; BUENO et al., 2001). O aumento no número de células durante a realização do ensaio indica que houve proliferação dos linfócitos T, ou seja, que estas células mantidas no cultivo celular foram ativadas. Várias metodologias permitem identificar a presença ou não da proliferação celular, como a contagem do número de células, a formação de colônias em microscopia, a incorporação do indicador radioativo timidina-triciada durante a síntese do DNA, ou a redução do azul de tetrazolium – MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio] (MOSMANN, 1983).

No ensaio de redução do MTT, a atividade metabólica e a respiração celular, via desidrogenases mitocondriais, degradam o reativo e promovem a formação de cristais corados de formazan. Estes cristais, quando dissolvidos, formam cor solúvel cuja intensidade é quantificada em densidade óptica por espectrofotometria. O resultado obtido em densidade óptica corresponde diretamente à atividade metabólica das células presentes na cultura celular, ou seja, quanto maior a

intensidade de cor maior o número de células presentes no cultivo e maior a proliferação celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). Esta metodologia é de custo relativamente baixo, sensível e de rápida aplicação, necessitando como equipamento apenas um leitor de microplacas e dispensando a complexidade do uso de radioatividade (MOSMANN, 1983).

Este modelo metodológico de redução do MTT tem sido empregado por vários autores na avaliação de extratos, frações e substâncias isoladas de plantas medicinais. Um exemplo de aplicação desta metodologia com revelação pelo MTT demonstrou que o extrato de *Clausena escavata*, planta usada na medicina popular no tratamento de câncer na Tailândia, possui atividade imunomodulatória com estímulo da fagocitose em camundongos (MANOSROI; SARAPHANCHOTIWITTHAYA; MANOSROI, 2003). Recentemente este mesmo modelo de estudo revelou o potencial estimulatório de quatro plantas mexicanas, a *Ocinum basilicum*, *Persea americana*, *Plantago virginica* e *Rosa spp.* sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos T de ratos (GOMEZ-FLORES et al., 2008).

A avaliação da proliferação celular revelada com timidina triciada também tem sido empregada, como na identificação do efeito imunossupressor da arborinina sobre a proliferação de células esplênicas frente à ConA e ao PWM. A arborinina é um alcalóide obtido da *Erthela bahiensis*, planta utilizada na medicina popular como diurética, antibiabética, antitérmica e expectorante (ROSEGHINI et al., 2006).

No modelo humano a aplicação do teste de linfoproliferação tem propiciado o mapeamento de grande número de exemplares da flora medicinal mundial com efeito imunomodulador. O extrato etanólico de *Acorus calamus* apresentou atividade inibitória da proliferação de células mononucleares humanas frente à PHA e à proteína derivada purificada (PPD), detectados no teste de linfoproliferação com revelação pela timidina triciada (MEHROTRA et al., 2003). Esta planta é tradicionalmente empregada na medicina Ayurvédica no tratamento de insônia, melancolia, neuroses, epilepsia, perda de memória e febre persistente, sendo que o mesmo extrato já havia demonstrado atividade sedativa, analgésica e hipotensiva (AGARWAL; SINGH, 1999).

Uma extensiva triagem realizada pelo teste de linfoproliferação com células humanas avaliou a atividade de 163 espécies de um total de 36 famílias de plantas brasileiras. Por meio de marcação do DNA com timidina triciada na revelação do teste de linfoproliferação com células mononucleares humanas, foi identificada

presença de atividade antiproliferativa em 20 dos 313 extratos obtidos extratos, correspondendo a 15 espécies estudadas (SOUZA-FAGUNDES et al., 2002).

Neste mesmo modelo, os extratos metanólicos das plantas de *Justicia gendarussa*, *Plumbago indica*, *Aloe vera* e *Aegle marmelos* usadas, mostraram significativa diminuição na proliferação de linfócitos estimulados com PHA, sugerindo que estas plantas afetam a proliferação de células T de forma dose-dependente (AROKIYARAJ et al., 2007). Contrariamente, os extratos obtidos a partir de *Gynostemma pentaphyllum*, *Houttunya cordata* e *Phytolacca americana* possuem atividade imunoestimulatória, sugerindo que linfócitos humanos podem ser usados para determinar efeitos de plantas medicinais no sistema imune (SRIWANTHANA et al., 2007).

A revelação do teste de linfoproliferação apresenta diversas possibilidades metodológicas, além da revelação com timidina. A microscopia óptica pode ser empregada na identificação e contagem de células blásticas coradas com corante hematológico e na contagem de formação de colônias de células mononucleares cultivadas. Estas variações metodológicas foram utilizadas por Pereyra et al. (2005) na identificação da propriedade imunomodulatória de *Minthostachys verticillata*, com estímulo da resposta imune mediada por células similar aos mitógenos PHA e PWM.

Por fim, o MTT tem sido empregado como método alternativo na revelação de testes de proliferação celular de atividade citotóxica, apresentado vantagens como a não utilização de material radioativo, menor tempo necessário para a leitura, inexistência de etapas de lavagens após a adição do substrato, sendo que este não interfere na quantificação do número e da função das células vivas ao final do ensaio (MOSMANN, 1983). Este modelo de revelação mostrou estímulo de 25% na proliferação de linfócitos humanos quando estes foram tratados *in vitro* com ácido okadálico isolado da esponja marinha *Halichondria okadai* (SILVA et al., 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Pesquisa experimental laboratorial de amostra biológica humana.

4.2 Local de estudo

O presente estudo foi realizado nos laboratórios 310 e 311 do Curso de Farmácia e no Laboratório de Cultivo Celular do Centro de Ciências da Saúde, Campus I da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

4.3 População/amostra

Foram estudadas células mononucleares obtidas do sangue periférico de 100 indivíduos saudáveis. As amostras foram colhidas com anti-coagulante heparina no momento da coleta de sangue para a execução de outros exames laboratoriais no Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC) da UNIVALI. Somente participaram da pesquisa doadores voluntários e que tinham como pedido médico a prescrição de exames de rotina.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos vigentes na UNIVALI, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre o assunto (BRASIL, 1996) e conta com parecer favorável pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI (parecer número 06/06).

4.4 Coleta de dados ou descrição dos procedimentos experimentais

Obtenção do material botânico

Os extratos metanólicos utilizados no presente estudo foram fornecidos pelos colaboradores do presente projeto, Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (*Calophyllum brasiliensis* e *Ipomoea pes-caprae*), Prof. Dr. Rivaldo Niero (*Matayba elaeagnoides*, *Maytenus robusta* e *Rubus imperialis*) e Profa. Dra. Maique Weber Biavatti (*Vernonia scorpioides*).

As raízes de *Calophyllum brasiliensis* foram coletadas na Trindade, Florianópolis - SC, com uma exsicata depositada no Herbário Barbosa Rodrigues em Itajaí-SC sob número VC Filho 007. A planta inteira de *Ipomoea pes-caprae* foi coletada na Praia da Esplanada, Jaguaruna - SC, e uma exsicata foi depositada no mesmo Herbário sob número V.C. Filho 009. As cascas de *Matayba elaeagnoides* foram coletadas no município de Caçador - SC, tendo uma exsicata depositada no mesmo Herbário sob número MTS 001. As partes aéreas de *Maytenus robusta* foram coletadas no Morro do Baú, Ilhota - SC, com uma exsicata depositada no mesmo Herbário sob número V.C. Filho 016. As partes aéreas de *Rubus imperialis* foram coletadas em São Sebastião, Treze de Maio - SC e uma exsicata foi depositada no mesmo Herbário sob número V.C. Filho 012. As folhas e inflorescências de *Vernonia scorpioides* coletadas em Navegantes - SC, em local previamente determinado, foram identificadas pela Dra. Ana Claudia Araújo, sendo comparada a exsicatas tombadas no Herbário Barbosa Rodrigues sob número HBR, M. Biavatti 11.

O extrato alcoólico das plantas descritas citadas acima foi preparado a partir do material vegetal seco e triturado. O líquido extrator empregado foi o metanol, em processo de maceração durante 10 dias em recipiente fechado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O material obtido foi filtrado e concentrado por evaporação e pressão negativa. Estudos realizados anteriormente com estes extratos metanólicos empregaram métodos espectroscópicos como infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 e técnicas bidimensionais para elucidação estrutural e caracterização fitoquímica (KROGH et al., 1999; NIERO et al., 1999; SILVA et al., 2000; NIERO et al., 2001; SOUZA, 2006; BUSKÜHL, 2007).

Os extratos metanólicos foram conservados em dessecador com sílica. No momento do uso, os extratos foram reconstituídos em 2% de dimetilsulfoxido (DMSO) (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ), constituindo junto com meio de cultura *Dulbelccos's Modified Eagles Médium* (DMEM, Sigma Inc., catálogo nº D7777, St. Louis, MO, USA) os extratos concentrados a 1 mg/mL. O extrato concentrado foi submetido a processo de filtração em membrana com poro de 0,22 µm para garantia da esterilidade do mesmo.

Teste de proliferação linfocitária

O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. As células mononucleares periféricas foram obtidas por separação em gradiente de densidade (Ficoll-Pasque™ Plus, Amersham Biosciences, Upsala, Suíça) e determinada a concentração e viabilidade celular com azul de Trypan (BOYUM, 1968). Somente foram utilizadas amostras com viabilidade superior a 90%.

O meio de cultura empregado nos experimentos de cultivo celular foi suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2% de bicarbonato de sódio a 10%, 1% de L-glutamina a 200 mM, 1% de HEPES a 10 mM e 110 mg/mL de piruvato de sódio (BUENO et al., 2001). Os ensaios foram realizados em triplicata e incubados em placas de cultura celular com 96 poços com fundo chato, com tampa e estéreis (TTP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 72 horas para PHA e PWM e ainda durante 144 horas para PWM, períodos estes determinados de acordo com a literatura (WAJNER et al., 1999; SOUZA-FAGUNDES et al., 2002; MEHROTRA et al., 2003; MONTELLI; SOARES; PERAÇOLI, 2003; BESSLER et al., 2005; DUARTE; SILVA, 2007; SILVA 2007).

O teste de proliferação com PHA a 5 µg/mL como controle positivo teve a concentração celular definida em 1×10^6 células/mL em estudo prévio com curva de crescimento realizado no laboratório (DUARTE; VIEIRA, 2007; SILVA et al., 2007). A partir deste dado, foi ensaiada esta mesma concentração celular frente ao PWM na concentração de 5 µg/mL (0,5 µg/cavidade), com o objetivo de verificar se esta mesma concentração poderia ser empregada com este mitógeno nos períodos de incubação de 72 e de 144 horas. Foram realizados seis experimentos em triplicata nesta etapa do estudo.

O teste de proliferação linfocitária avaliou os extratos metanólicos das plantas nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente 1, 5, 10 e 20 µg/cavidade, na presença e na ausência dos mitógenos. Os ensaios com os extratos incluíram: a) teste de proliferação celular na ausência dos mitógenos, com incubação de células e extrato com meio de cultura; e b) teste de proliferação celular na presença dos mitógenos, com incubação de células e extrato com PHA ou PWM, isoladamente, em meio de cultura.

Os procedimentos experimentais na cultura celular incluíram também diversos controles internos, a saber: a) controle do meio de cultura, com plaqueamento de meio de cultura apenas; b) controle dos mitógenos, com incubação de PHA e PWM, separadamente, com meio de cultura; c) controle dos extratos, com incubação do extrato com meio de cultura; d) controle negativo de proliferação, com incubação de células e meio de cultura; e) controle positivo de proliferação para PHA, com incubação de células e PHA com meio de cultura; f) controle positivo de proliferação para PWM, com incubação de células e PWM com meio de cultura.

A proliferação celular foi identificada pelo ensaio de redução do MTT, que forma coloração azulada quando o MTT é convertido em sal de formazan pela atividade da desidrogenase mitocondrial das células vivas durante a respiração celular e consumo de O₂ (MOSMANN, 1983). Para este procedimento, foram adicionados 10 µL de MTT (Amresco, Solon, Ohio, USA) a 5 mg/mL em NaCl 0,9% a cada cavidade da placa cerca de três horas antes do final do período de incubação. Ao término do período de incubação foram adicionados 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS - Amresco, Solon, Ohio, USA) a 10% em ácido clorídrico a 0,001 N e deixado *over night* para a completa dissolução dos cristais. A intensidade de cor formada pela degradação do MTT foi quantificada, em densidade óptica, por espectrofotômetro de microplacas a 540 nm (Quick ELISA, Drake, São Paulo, SP) (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). Os extratos com densidade óptica acima de 0,300 quando incubados com meio de cultura apenas tiveram o valor decrescido na densidade óptica do teste de linfoproliferação, evitando assim a superestimação do resultado obtido.

Os resultados obtidos no teste de linfoproliferação com os extratos foram apresentados em percentagem média de crescimento de quatro experimentos

realizados em triplicata. A percentagem de crescimento elimina as variações inter-testes da execução do procedimento e é obtida pela fórmula

$$\% \text{ crescimento} = 100 \times (\text{DOt} - \text{DOc}) / \text{DOc}$$

onde DOt corresponde à densidade óptica do teste e DOc refere-se à densidade óptica do controle negativo de proliferação, correspondendo à atividade metabólica das células presentes na cultura celular, ou seja, à viabilidade das mesmas. Desta forma, um resultado positivo indica que o composto adicionado ao cultivo induziu a proliferação celular (MANOSROI; SARAPHANCHOTIWITTHAYA; MANOSROI, 2003; RISCO et al., 2003).

4.5 Análise e discussão dos dados

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pelos testes Kruskal-Wallis e U de Mann-Whitney para a determinação da significância estatística dos mesmos. A correlação entre a concentração do extrato e efeito sobre a proliferação celular foi avaliada pela curva de crescimento obtida a partir da linha de tendência polinomial na ordem 3, com valor $R^2=1,0$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do sistema imune, o termo imunomodulação é comumente empregado devido ao controle e equilíbrio necessários entre as atividades estimulatórias e supressoras do sistema para a manutenção da integridade do organismo (PHILLIPSON, 2003). Várias metodologias laboratoriais que permitem a avaliação da resposta imune têm sido desenvolvidas, principalmente a partir das duas últimas décadas. Atualmente estas metodologias apresentam emprego amplo e efetivo devido às condições de padronização das mesmas (HENRY, 1999; ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

O efeito dos extratos metanólicos das plantas medicinais sobre a atividade imunomodulatória aqui apresentado foi determinado pelo modelo *in vitro* de linfoproliferação com revelação pelo MTT. O acréscimo na redução do MTT pelas enzimas mitocondriais representa o aumento no número de células durante a realização do ensaio, indicando que houve proliferação dos linfócitos T, ou seja, que estas células mantidas no cultivo celular foram ativadas. Desta forma, este teste permite verificar a estimulação ou supressão dos linfócitos frente aos compostos naturais, simultaneamente ou não aos mitógenos (MOSMANN 1983; PANDIMA DEVI et al., 2003; ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007).

A aplicação do teste de proliferação linfocitária somente pode ser realizada após a certificação de que as variáveis envolvidas no ensaio foram adequadamente estabelecidas, a fim de obter o real resultado do composto alvo em estudo. O período de incubação de 72 horas para PHA no cultivo celular foi determinado junto à literatura (WAJNER et al., 1999; BUENO et al., 2001; SOUZA-FAGUNDES et al., 2002; MEHROTRA et al., 2003; MONTELLI; SOARES; PERAÇOLI, 2003; BESSLER et al., 2005; DUARTE; VIEIRA, 2007).

O teste de proliferação, previamente padronizado por meio de curva de crescimento, definiu o uso de PHA a 5 µg/mL (0,5 µg/cavidade) e de células mononucleares humanas a 1×10^6 células/mL (1×10^5 células/cavidade) (DUARTE; VIEIRA, 2007; SILVA et al., 2007). A mesma concentração celular de 1×10^6 células/mL (1×10^5 células/cavidade) foi avaliada frente ao PWM na concentração de 5 µg/mL (0,5 µg/cavidade) em incubação de 72 horas (Figura 7A) e de 144 horas

(Figura 7B), demonstrando viabilidade no uso como controle positivo da proliferação celular. Esta mesma concentração celular tem sido descrita na literatura em ensaios de cultivo de células mononucleares humanas, inclusive em testes de linfoproliferação (BUENO et al, 2001; SOUZA-FAGUNDES et al., 2002).

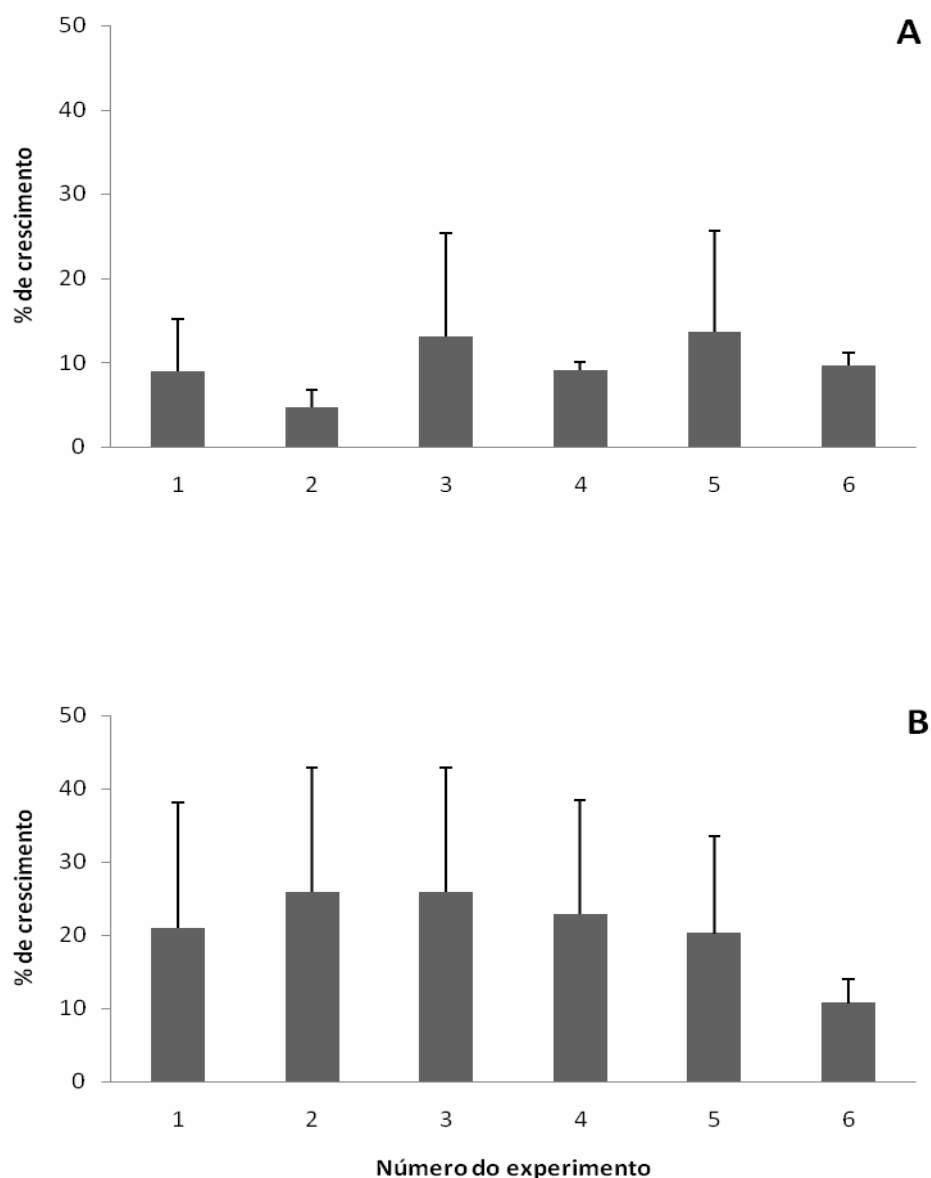
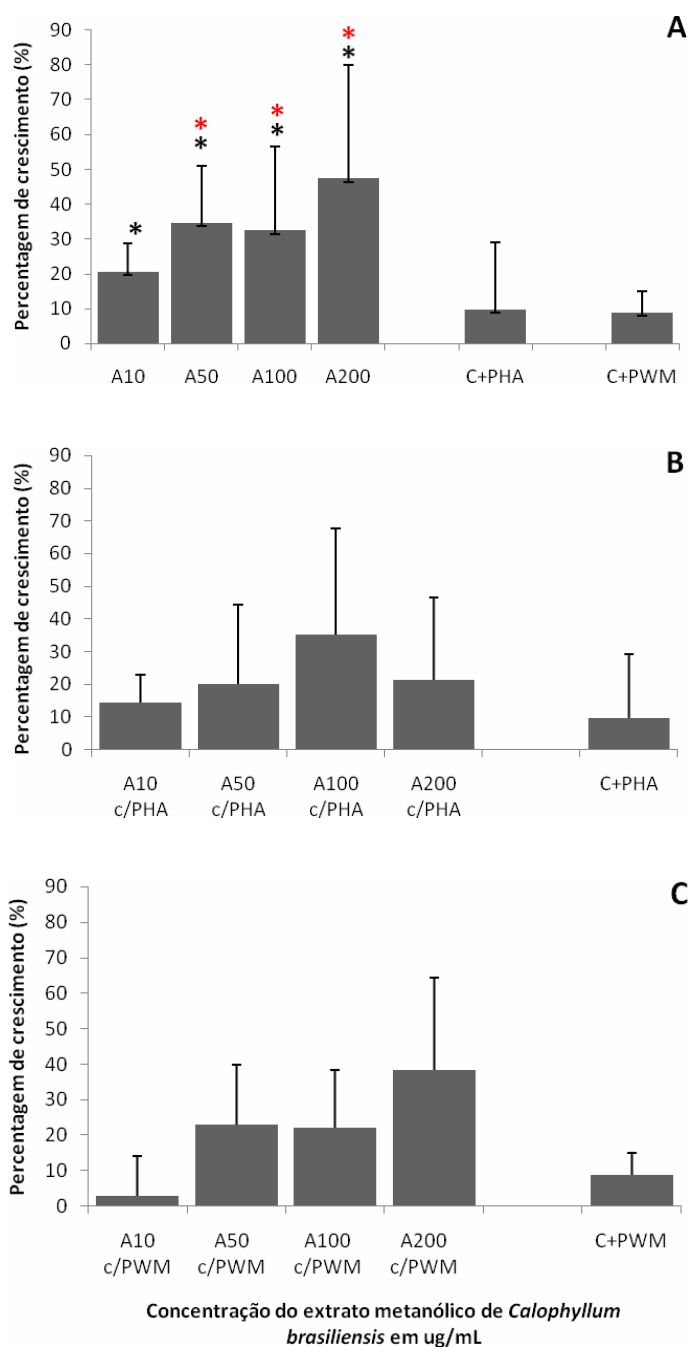


Figura 7. Proliferação das células mononucleares humanas (1×10^6 células/mL) frente ao estímulo de *pokeweed mitogen* ($5 \mu\text{g/mL}$) em incubação a 37°C com 5% de CO_2 durante 72 horas (A) e 144 horas (B). Resultados expressam a média e desvio padrão da triplicada de cada experimento.

5.1 *Calophyllum brasiliensis*

As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados obtidos com o extrato metanólico de *Calophyllum brasiliensis* nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL, em incubação isolada ou simultânea aos mitógenos, representando a percentagem média de crescimento de quatro experimentos realizados em triplicatas. As células mononucleares humanas incubadas isoladamente com o extrato por período de 72 horas mostraram percentagem de crescimento média de 20,6 a 47,4%, com maior crescimento a 200 µg/mL (Figura 8A). Quando o extrato foi incubado simultaneamente aos mitógenos, a percentagem de crescimento foi de 14,3 a 35,3% para PHA (Figura 8B) e de 2,9 a 38,5% para PWM, respectivamente com maior crescimento a 100 µg/mL e a 200 µg/mL (Figura 8C).

Embora o extrato tenha apresentado resultados de proliferação celular positivos, a indução do crescimento celular foi significativamente superior aos controles positivos apenas quando o extrato foi incubado isoladamente no cultivo celular (Figura 8A), nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL frente ao controle positivo PHA (9,7%) ($p \leq 0,041$) e nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL frente ao controle positivo PWM (8,9%) ($p \leq 0,049$). O resultado encontrado com 100 µg/mL não mostrou significância devido à elevada variação obtida, demonstrada na figura pelo desvio padrão, inclusive com média similar à concentração de 50 µg/mL. Como todo ensaio biológico com cultivo de células primárias, a variabilidade nos ensaios é determinada por vários fatores, como genética e condição imune do doador, execução do procedimento extremamente laboriosa e demorada, preparo diário das diluições do extrato, entre outros. Considerando o período de 72 horas é usualmente utilizado no teste de linfoproliferação para avaliar a ativação de linfócitos T, estes resultados sugerem que extrato metanólico de *Calophyllum brasiliensis* induz a proliferação deste tipo celular.

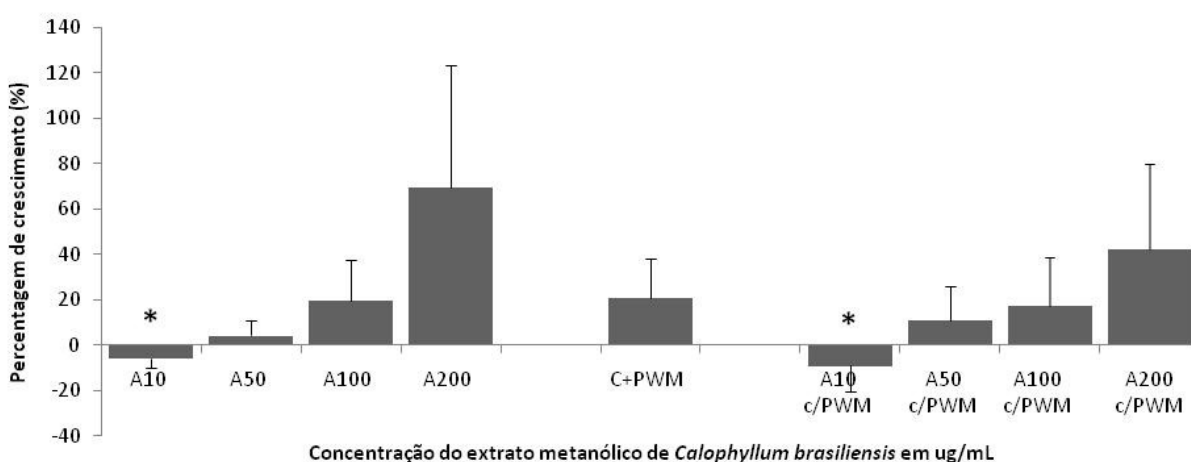


C+ PHA: controle positivo com fitohemaglutinina (PHA); C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); * $p < 0,05$ em comparação ao C+ PHA; * $p < 0,05$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 8. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e *pokeweed mitogen* (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂ frente a extrato metanólico *Calophyllum brasiliensis*.

O aumento no período de incubação para 144 horas para avaliação da proliferação de linfócitos B revelou percentagem de crescimento de -6,0 a 69,5% quando incubado extrato isolado no cultivo celular, e de -9,0 a 42,4% quando incubado junto ao mitógeno PWM (Figura 9).

Dentre as quatro concentrações do extrato avaliadas, apenas a concentração de 10 µg/mL tanto isolada quanto com o mitógeno, mostrou significância frente ao controle positivo PWM (21,0%) devido à inibição na proliferação celular, inclusive da própria atividade do PWM ($p=0,029$). Assim, a combinação dos resultados obtidos, somado ao fato do PWM ativar linfócitos B dependentes de linfócitos T (ROCHA; GORESCU; BELTRAME, 2007), sugere que o extrato metanólico de *Calophyllum brasiliensis* atua sobre a proliferação apenas dos linfócitos T.

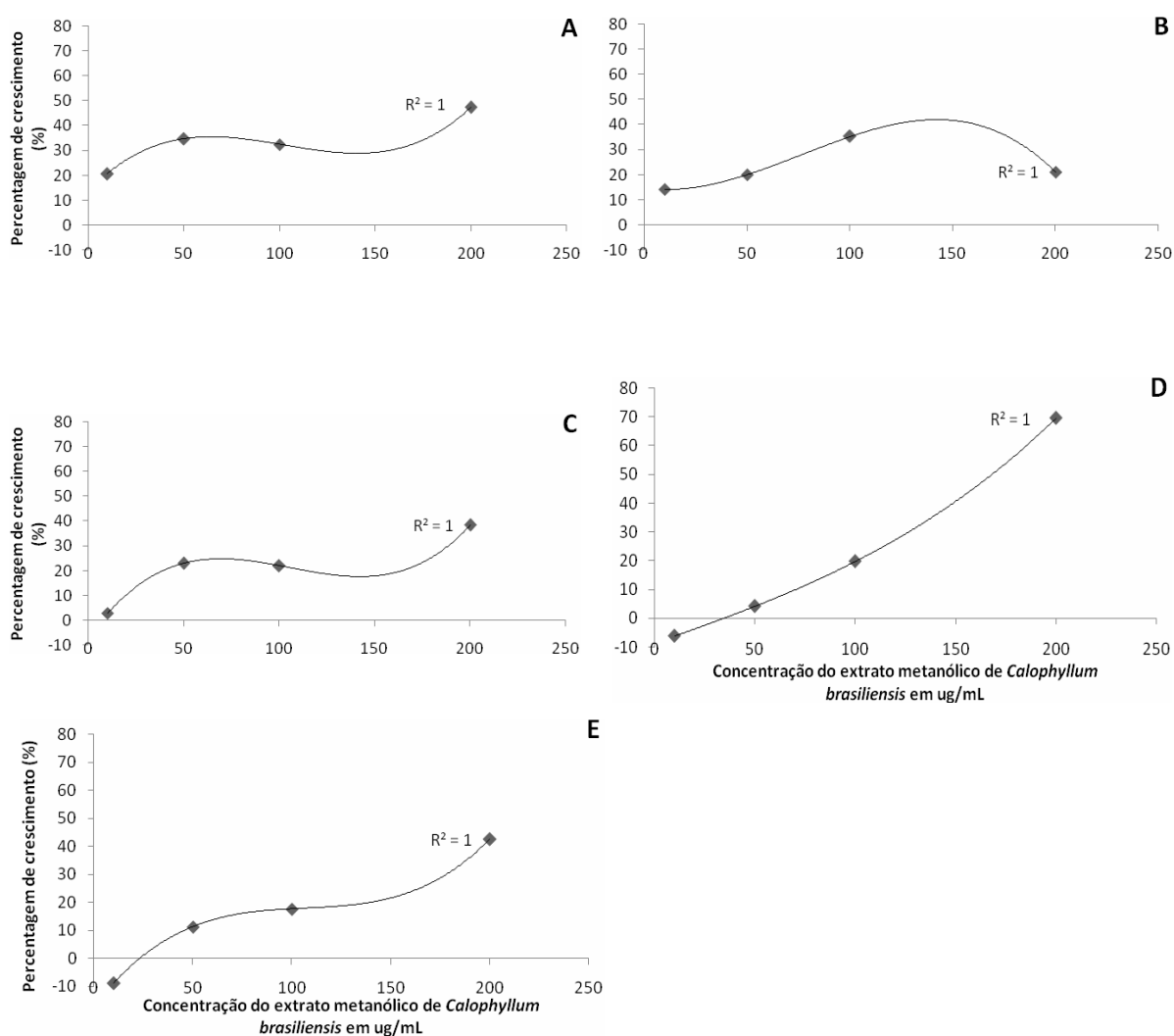


C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); * $p<0,05$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 9. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico *pokeweed mitogen* (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO₂ frente a extrato metanólico *Calophyllum brasiliensis*.

O extrato metanólico de *Calophyllum brasiliensis* mostrou diferença entre as quatro concentrações empregadas no ensaio com células mononucleares humanas apenas para o período de incubação de 144 horas ($p\leq 0,033$), com efeito dose-

resposta verificado também em curva de crescimento obtida a partir da linha de tendência polinomial na ordem 3, com valor $R^2=1,0$ (Figuras 10D e 10E). No entanto, a significância frente o controle positivo PWM foi restrito à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, cuja percentagem de crescimento foi negativa, desvalorizando este efeito dose-resposta.



R^2 : coeficiente de determinação. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 10. Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de *Calophyllum brasiliensis* incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao pokeweed mitogen a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO_2 durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).

O extrato metanólico de *Calophyllum brasiliensis* na avaliação da atividade imunomoduladora frente à proliferação de células esplênicas murinas demonstrou, assim como observado no presente estudo, que o extrato estimula a proliferação de linfócitos T, possibilitando um incremento na resposta imune celular (ZANDONAI, 2007). A fração hexânica desta espécie também mostrou aumento da hemopoiese em camundongos, embora sem influência sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (BREHMER, 2005). Esta fração não apresentou toxicidade para a linhagem linfocitária humana MT2, mas teve importante inibição da atividade da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HUERTA-REYES et al., 2004).

As investigações fitoquímicas do gênero *Calophyllum* mostraram a presença de grande variedade de compostos, incluindo xantonas, cumarinas, biflavonoides, chalconas, benzofenonas e triterpenos (ITO et al., 1999; ABE et al., 2004; ISAIAS et al., 2004; GASPAROTTO et al., 2005), além de quercitina, ácido gálico, ácido protocatético, hiperosideo, amantoflavona (SILVA et al., 2001) e ácido betulínico (BUFFON, 2005).

A cumarina tricíclica GUT-70, isolada das cascas de *Calophyllum brasiliensis*, foi caracterizada como agente natural contra o câncer, pois inibiu o crescimento de seis linhagens de células leucêmicas humanas sem causar inibição da proliferação dos leucócitos e hepatócitos normais (ITO et al., 2003; KIMURA et al., 2005).

Um estudo feito com a isocumarina Tumberginol, extraída de *Hydrangeae dulcis folium*, mostrou que esta não suprime a proliferação de linfócitos T estimulados com PHA, embora suprima significativamente a proliferação desta população celular quando estimulada por concanavalina A (ConA) e de linfócitos B estimulados com o mitógeno lipopolisacárido (LPS) (SHIMODA et al., 1998).

Derivados do triterpeno friedelina obtido da casca de *Quercus suber* provaram potente inibição da proliferação de linfócitos humanos e do crescimento de linhagem de células de câncer humano (MOITEIRO et al., 2001). Este mesmo composto friedelina, isolado das folhas da *Justicia gendarussa*, revelou atividade inibitória da proliferação de linfócitos humanos, com inibição máxima de 85% quanto utilizado o extrato metanólico da planta (AROKIYARAJ et al., 2007). Conforme literatura, o ácido betulínico, outro composto também encontrado na *Calophyllum brasiliensis*, tem sido relatado como promissor agente anti-câncer contra melanoma, inibindo o crescimento das células cancerosas e induzindo a apoptose (PETTIT, 1996).

Embora o triterpeno friedelina relatado na literatura como inibidor da proliferação de linfócitos esteja presente também na *Calophyllum brasiliensis*, a concentração do mesmo no extrato utilizado neste estudo pode ser inferior aos demais compostos que estimulam a proliferação celular. Desta forma, é possível inferir que compostos como as cumarinas estariam sobrepondo a atividade no cultivo celular e mantendo a estimulação da proliferação linfocitária. Este achado é um forte indicativo para a continuidade nos estudos de frações e compostos isolados obtidos a partir da *Calophyllum brasiliensis* para a identificação das atividades específicas de cada substância.

Assim, de acordo com os dados da literatura descritos acima (SHIMODA et al., 1998; ITO et al., 2003; KIMURA et al., 2005) e os resultados aqui reportados, a substâncias presentes na *Calophyllum brasiliensis* sugerem efeito tóxico às células tumorais, mas com efeito citoprotetor às células normais e inclusive com estímulo na proliferação de linfócitos T.

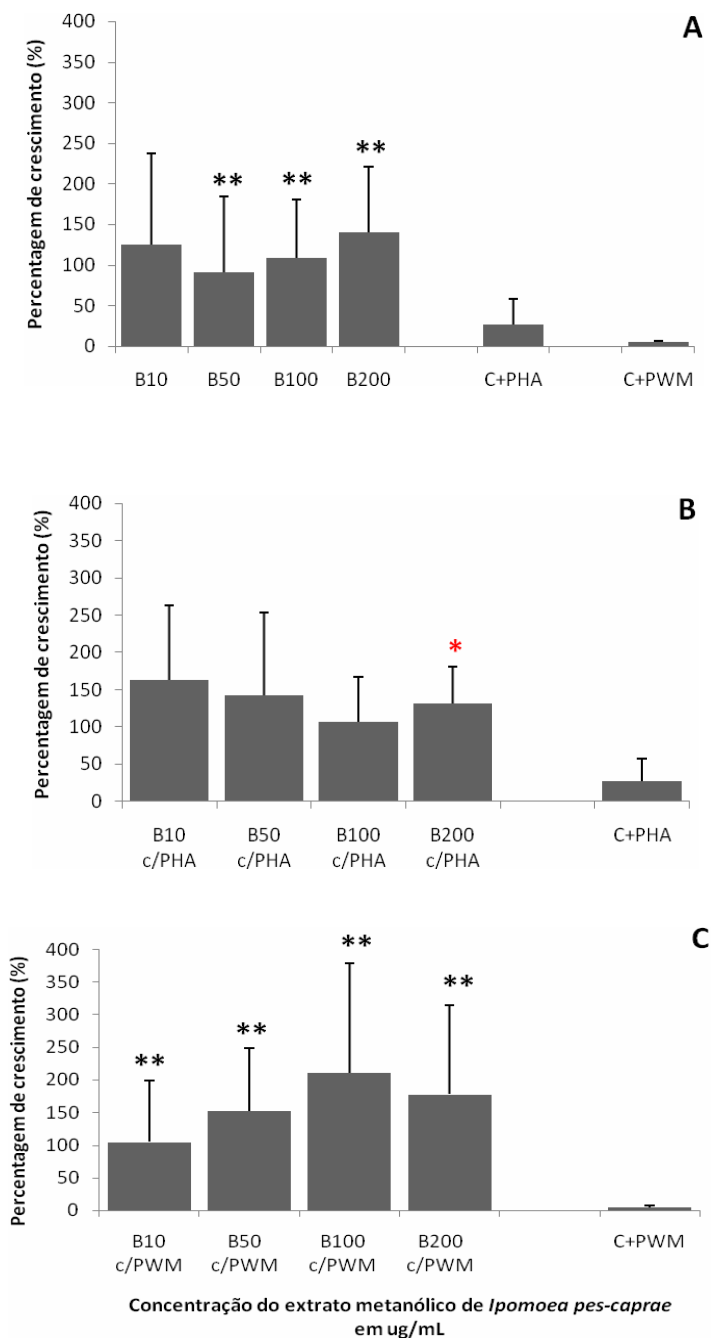
5.2 *Ipomoea pes-caprae*

As Figuras 11 e 12 apresentam os resultados obtidos com o extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL, em incubação isolada ou simultânea aos mitógenos, representando a percentagem média de crescimento de quatro experimentos realizados em triplicatas.

As células mononucleares humanas incubadas isoladamente com o extrato por período de 72 horas mostraram percentagem de crescimento média de 90,6 a 140,8%, com maior crescimento a 200 µg/mL (Figura 11A). Quando o extrato foi incubado simultaneamente aos mitógenos, a percentagem de crescimento foi de 106,5 a 162,4% com maior crescimento em 10 µg/mL para PHA (Figura 11B) e de 104,7 a 211,1% para PWM e maior crescimento a 100 µg/mL (Figura 11C).

O extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* parece induzir a proliferação de linfócitos T. Esta inferência é justificada pelo fato do extrato elevar significativamente o crescimento celular quando o mesmo foi exposto em 72 horas junto aos mitógenos, na concentração de 200 µg/mL com PHA (Figura 11B) ($p=0,038$) e a 10, 50, 100 e 200 µg/mL com PWM (Figura 11C) ($p=0,008$). O extrato também elevou significativamente o crescimento celular quando o extrato foi incubado isoladamente

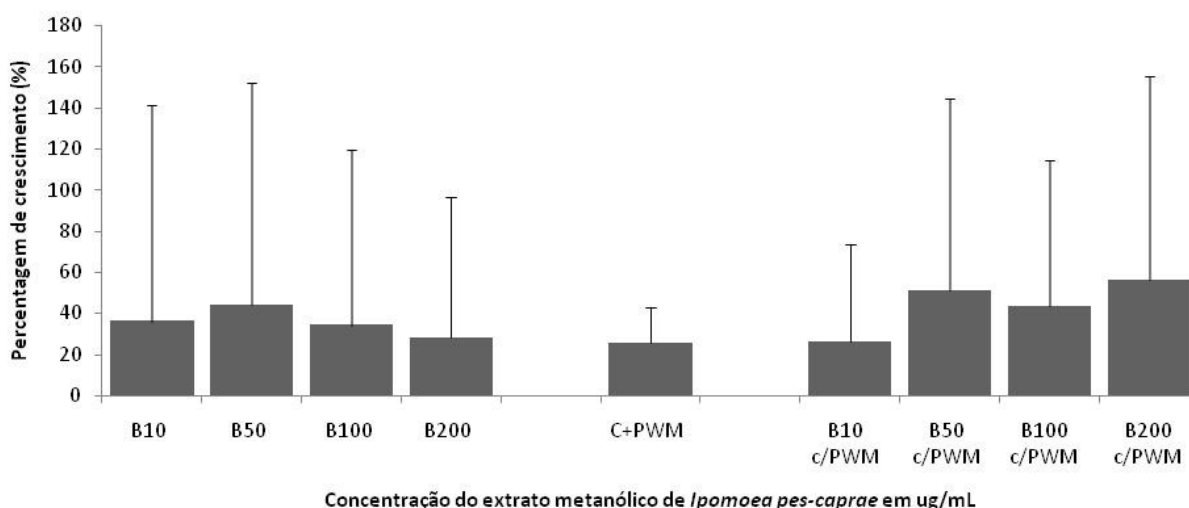
no cultivo celular nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, frente ao controle positivo PWM (4,7%) (Figura 11A) ($p=0,008$), o que não pode ser detectado em comparação ao controle positivo PHA devido à variância dos resultados do mesmo.



C+ PHA: controle positivo com fitohemaglutinina (PHA); C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); * $p < 0,05$ em comparação ao C+ PHA; ** $p < 0,01$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 11. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *pokeweed mitogen* (PWM, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em incubação de 72 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 frente a extrato metanólico *Ipomoea pes-caprae*.

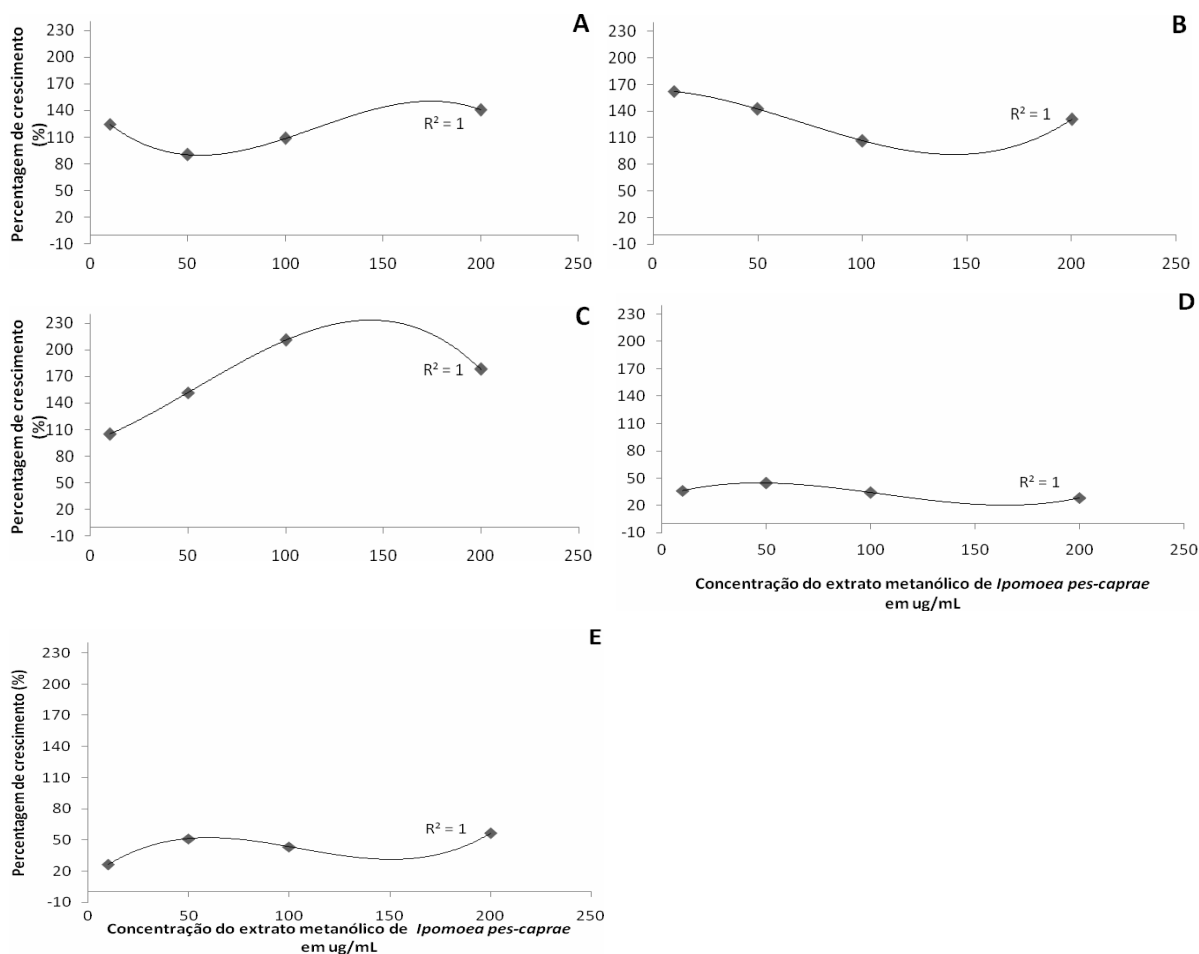
A manutenção do cultivo celular por 144 horas mostrou menor indução na proliferação celular do que em 72 horas, de 28,4 a 44,4% quando incubado extrato isoladamente, e de 26,2 a 56,3% quando incubado junto ao PWM, com maior crescimento a 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 12). A somatória deste menor crescimento celular, do maior desvio padrão obtido nos experimentos, também do próprio crescimento obtido no controle positivo PWM (25,8%) mostrou que não há diferença significativa entre os mesmos ($p \geq 0,343$). Desta maneira, os resultados obtidos do o extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* sugerem que o mesmo tem ação apenas sobre a proliferação dos linfócitos T.



C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM). Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 12. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em porcentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico *pokeweed mitogen* (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO_2 frente a extrato metanólico *Ipomoea pes-caprae*.

As diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* utilizadas não demonstraram significância entre elas, bem como efeito dose-resposta, tanto em 72 horas de incubação quanto em 144 horas (Figura 13).



R^2 : coeficiente de determinação. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 13. Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao *pokeweed mitogen* a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO_2 durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).

Estudos fitoquímicos da *Ipomoea pes-caprae* têm identificado a presença de esteróides, terpenóides, alcalóides e flavonóides (SOUZA et al., 2000), de β -damascenona, E-fitol, ácido betulínico, triterpenos α e β -amirina, acetatos, isoquercitinas (PONGAPRAYOON et al., 1992; SOUZA et al., 2000) e isoprenóides (KROGH et al., 1999).

Os triterpenos e os flavonóides têm sido descritos na literatura como inibidores da proliferação de linfócitos. O triterpeno friedelina isolado tanto da casca de *Quercus suber* (MOITEIRO et al., 2001) quanto das folhas de *Justicia gendarussa*

(AROKIYARAJ et al., 2007), apresentou inibição da proliferação de linfócitos humanos. Igualmente, os flavonóides extraídos da *Alternanthera brasiliana* mostraram esta mesma atividade anti-proliferativa (BROCHADO et al., 2003).

Embora flavonóides e triterpenos estejam presentes na *Ipomoea pes-caprae*, a ação destes compostos parece estar sobreposta a atividade de outros, uma vez que os resultados aqui obtidos mostraram aumento da proliferação celular com ativação dos linfócitos T. Esta hipótese é suportada pela observação do estímulo da proliferação de leucócitos na medula óssea de camundongos promovido pelo extrato desta planta (BREHMER, 2005), bem como pela indução dose-dependente na proliferação de células esplênicas murinas (COELHO et al., 2007; COELHO; FERREIRA, 2007; ZANDONAI, 2007).

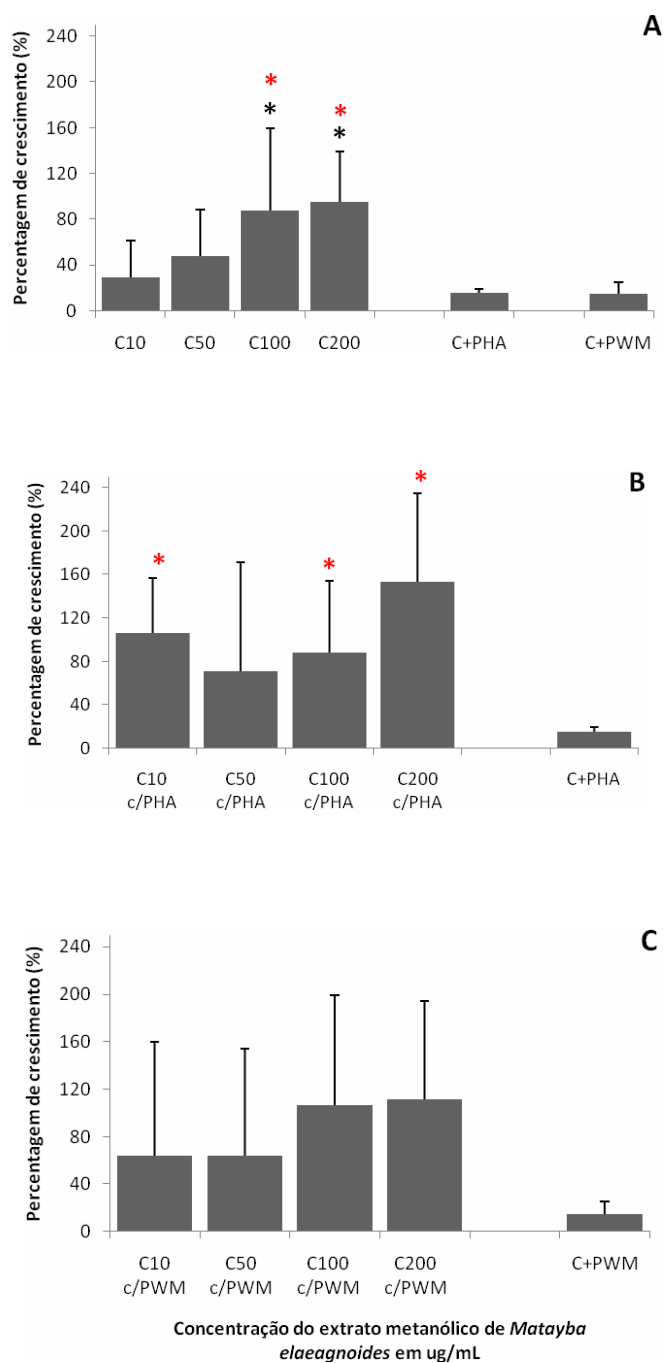
Considerando ainda que a literatura descreve o ácido betulínico, também presente nesta espécie, como promissor agente anti-câncer contra melanoma ao inibir o crescimento das células cancerosas e induzir apoptose (PETTIT, 1996), somado ao achado estimulador sobre a resposta linfocitária, a continuidade dos estudos com frações e compostos isolados desta espécie podem contribuir com os avanços na área da imunoterapia.

5.3 *Matayba elaeagnoides*

As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados obtidos com o extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL, em incubação isolada ou simultânea aos mitógenos, representando a percentagem média de crescimento de quatro experimentos realizados em triplicatas. As células mononucleares humanas incubadas isoladamente com o extrato por período de 72 horas mostraram percentagem de crescimento média de 29 a 95,6%, com maior crescimento a 200 µg/mL (Figura 14A). Quando o extrato foi incubado simultaneamente aos mitógenos, a percentagem de crescimento foi de 71 a 153,5% para PHA (Figura 14B) e de 63,9 a 111,7% para PWM (Figura 14C), ambos com maior crescimento a 200 µg/mL.

A indução do crescimento celular foi significativamente superior aos controles positivos quando o extrato foi incubado isoladamente no cultivo celular nas concentrações de 100 e 200 µg/mL frente aos controles positivos PHA (15,4%)

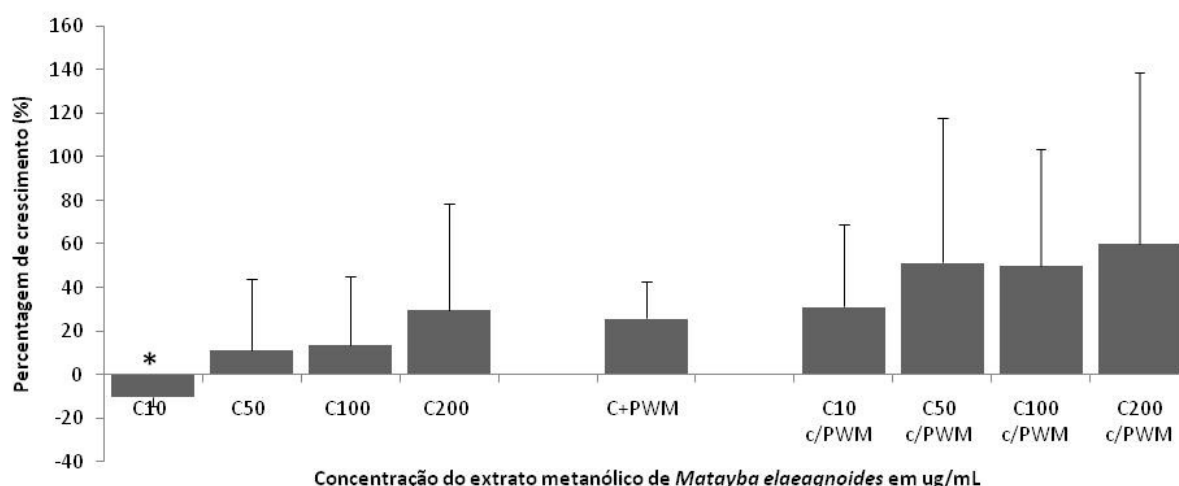
($p=0,029$) e PWM (14,6%) ($p= 0,029$) (Figura 14A), mostrando que o extrato tem por si só atividade imunoestimuladora sobre a proliferação celular. Quando incubado simultaneamente aos mitógenos somente houve significância frente à PHA nas concentrações de 10, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,029$), enquanto que comparado ao PWM não houve significância estatística nestas condições de ensaio devido ao elevado desvio padrão obtido ($p\geq 0,343$).



C+ PHA: controle positivo com fitohemaglutinina (PHA); C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); * $p < 0,05$ em comparação ao C+ PHA; * $p < 0,05$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 14. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e *pokeweed mitogen* (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂ frente a extrato metanólico *Matayba elaeagnoides*.

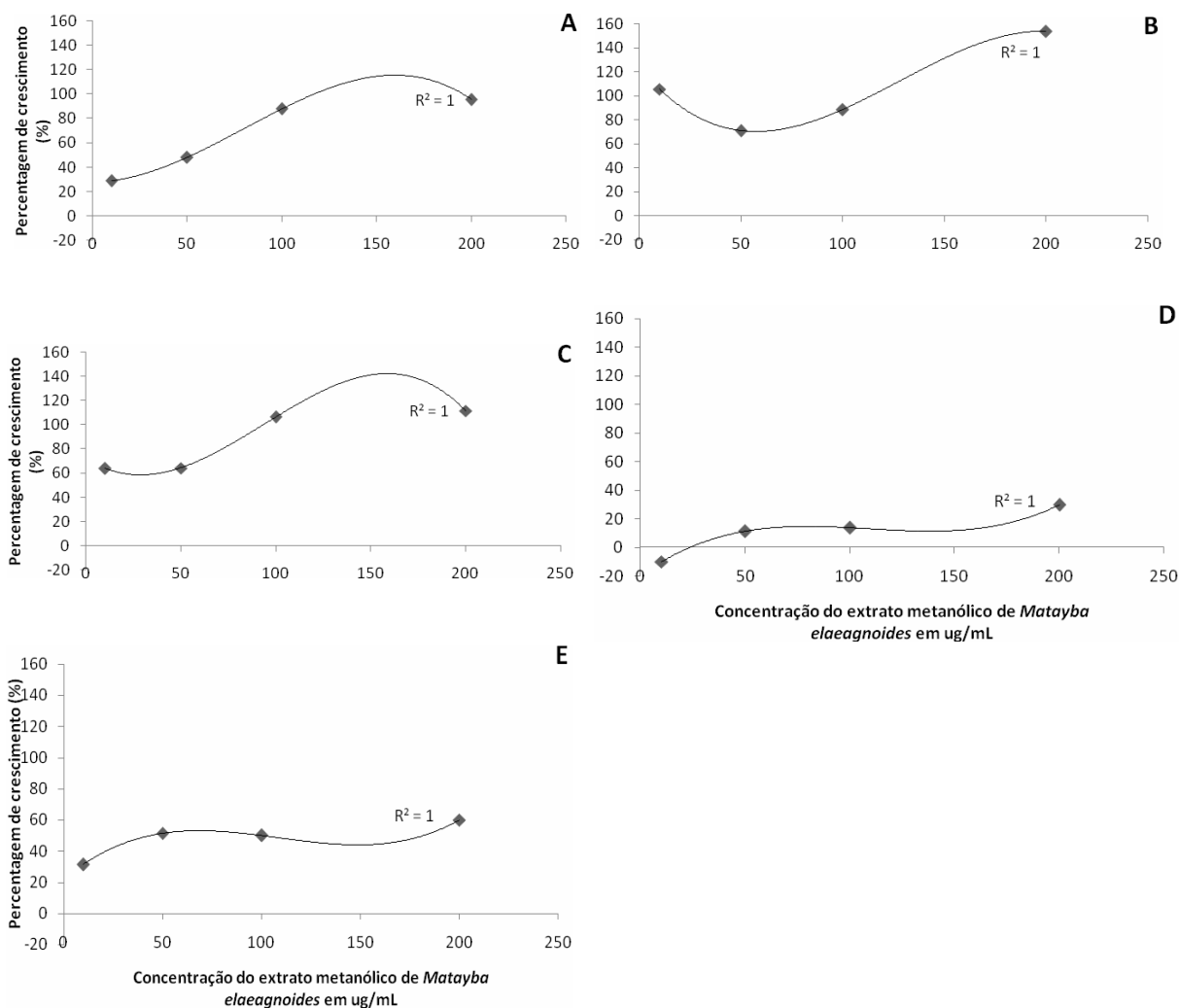
A avaliação do efeito do extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* sobre a proliferação celular quando o período de incubação foi aumentado para 144 horas revelou percentagem de crescimento de -10,1 a 29,7% quando incubado isolado no cultivo celular, e de 31,3 a 60,2% quando incubado junto ao PWM (Figura 15). Considerando a percentagem de crescimento do controle positivo (25,9%), apenas o extrato isolado e na concentração de 10 µg/mL mostrou significância, cujo resultado observado foi o efeito inibidor da proliferação celular ($p=0,029$). Portanto, a combinação dos resultados obtidos em 72 e 144 horas sugere que o extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* atua apenas sobre a proliferação dos linfócitos T.



C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); * $p<0,05$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 15. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico *pokeweed mitogen* (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO₂ frente a extrato metanólico *Matayba elaeagnoides*.

O extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* demonstrou tendência ao efeito dose-resposta em concentrações inferiores a 100 µg/mL (Figura 16).



R^2 : coeficiente de determinação. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 16. Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao *pokeweed mitogen* a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO_2 durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).

De forma semelhante à *Calophyllum brasiliensis* e à *Ipomoea pes-caprae*, os resultados obtidos mostraram aumento da proliferação celular com ativação dos linfócitos T, atividade esta ainda sem relatos na literatura até o presente momento.

A partir do extrato metanólico das cascas de *Matayba elaeagnoides* foram isoladas diversas substâncias, como compostos esteroidal, cumarinas, triterpenos (lupeol, α e β amirina, betulina, etc), sitosterol, escopoletina, flavonóides, entre

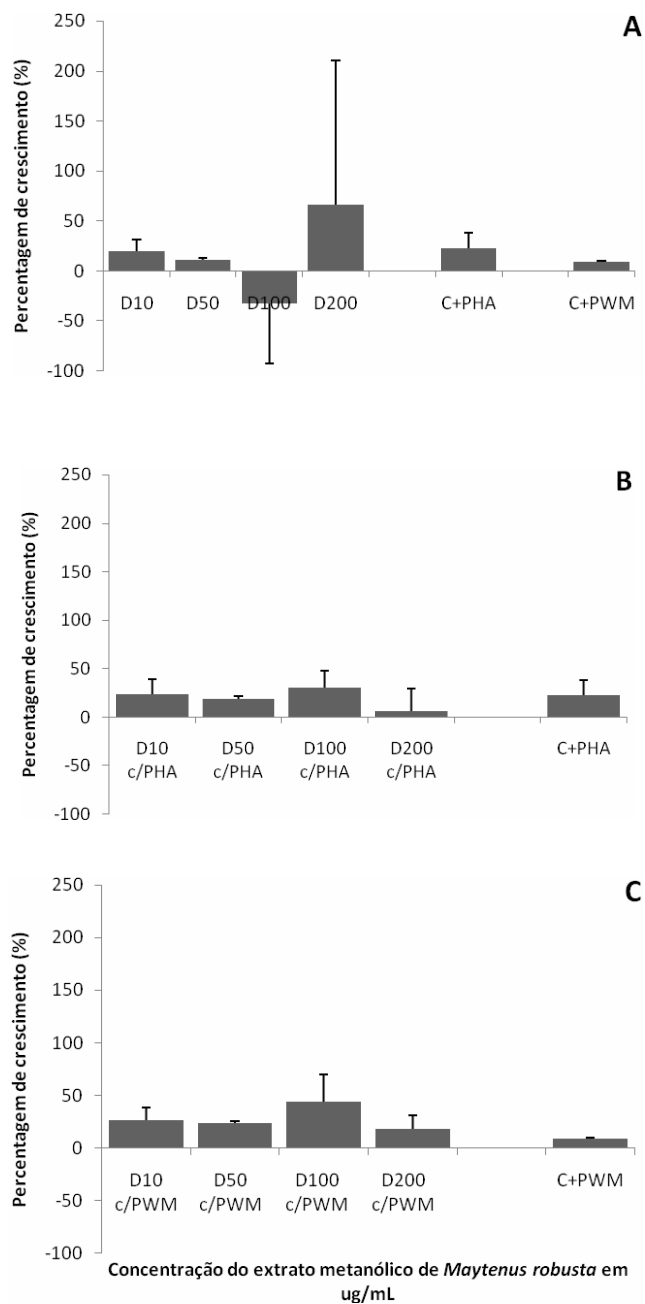
outros (SOUZA, 2006). As cumarinas extraídas de outras plantas medicinais têm sido relacionadas à atividade estimuladora sobre os linfócitos (SHIMODA et al., 1998). A transposição desta atividade das cumarinas ao estudo aqui apresentado pode justificar parcialmente o achado estimulador do extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* sobre a população de linfócitos T. Ainda, outros compostos presentes no extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* podem estar se sobrepondo à atividade inibitória sobre a proliferação de células mononucleares humanas induzida pelos flavonóides e triterpenos (MOITEIRO et al., 2001; AROKIYARAJ et al., 2007).

5.4 *Maytenus robusta*

Os resultados obtidos com o extrato metanólico de *Maytenus robusta* nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL, em incubação isolada ou simultaneamente aos mitógenos PHA e PWM, estão apresentados nas Figuras 17 e 18, representando a percentagem média de crescimento de quatro experimentos realizados em triplicatas.

O extrato incubado isoladamente com as células durante 72 horas (Figura 17A) mostrou percentagem de crescimento média de -32,9 a 66,2%, com maior crescimento a 200 µg/mL. Quando o extrato foi incubado simultaneamente aos mitógenos a percentagem de crescimento variou entre 6,1 a 30,8% para PHA (22,8%) e 18,2 a 43,6% para PWM (9,1%), com maior crescimento a 100 µg/mL para ambos (Figuras 17B e 17C).

Considerando a percentagem de crescimento obtida nos controles positivos, a análise estatística mostrou não haver indução significativa da proliferação celular, independentemente da concentração utilizada e uso da PHA ou do PWM junto ao extrato. Por meio destes resultados é possível concluir que o extrato metanólico de *Maytenus robusta* não influencia a proliferação de linfócitos T.

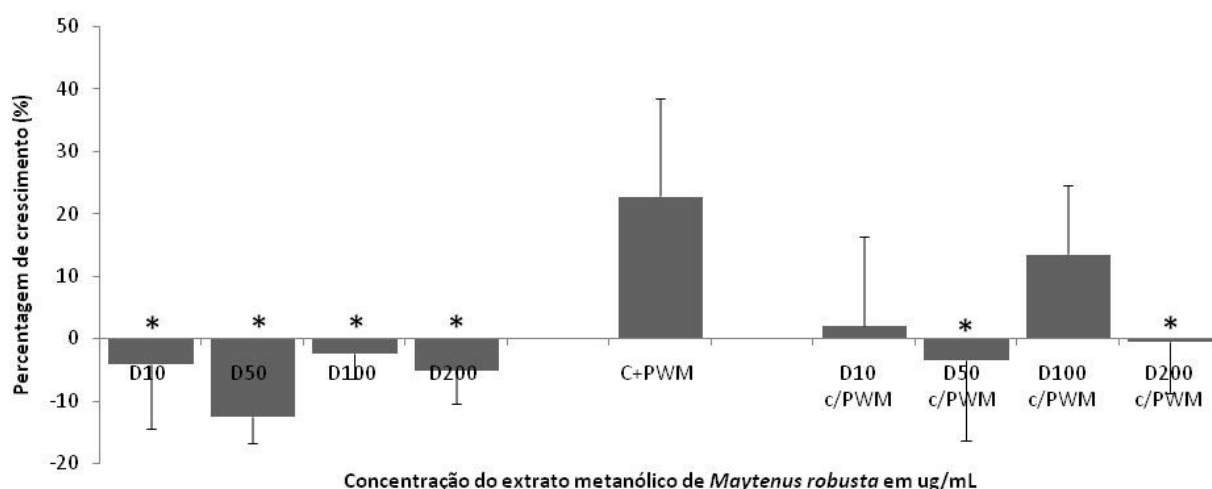


C+ PHA: controle positivo com fitohemaglutinina (PHA); C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM). Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 17. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e *pokeweed mitogen* (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂ frente a extrato metanólico *Maytenus robusta*.

Quando o período de incubação foi aumentado para 144 horas (Figura 18), o extrato revelou crescimento variando de -12,6 a -2,5% isoladamente, e -3,6 a 13,5

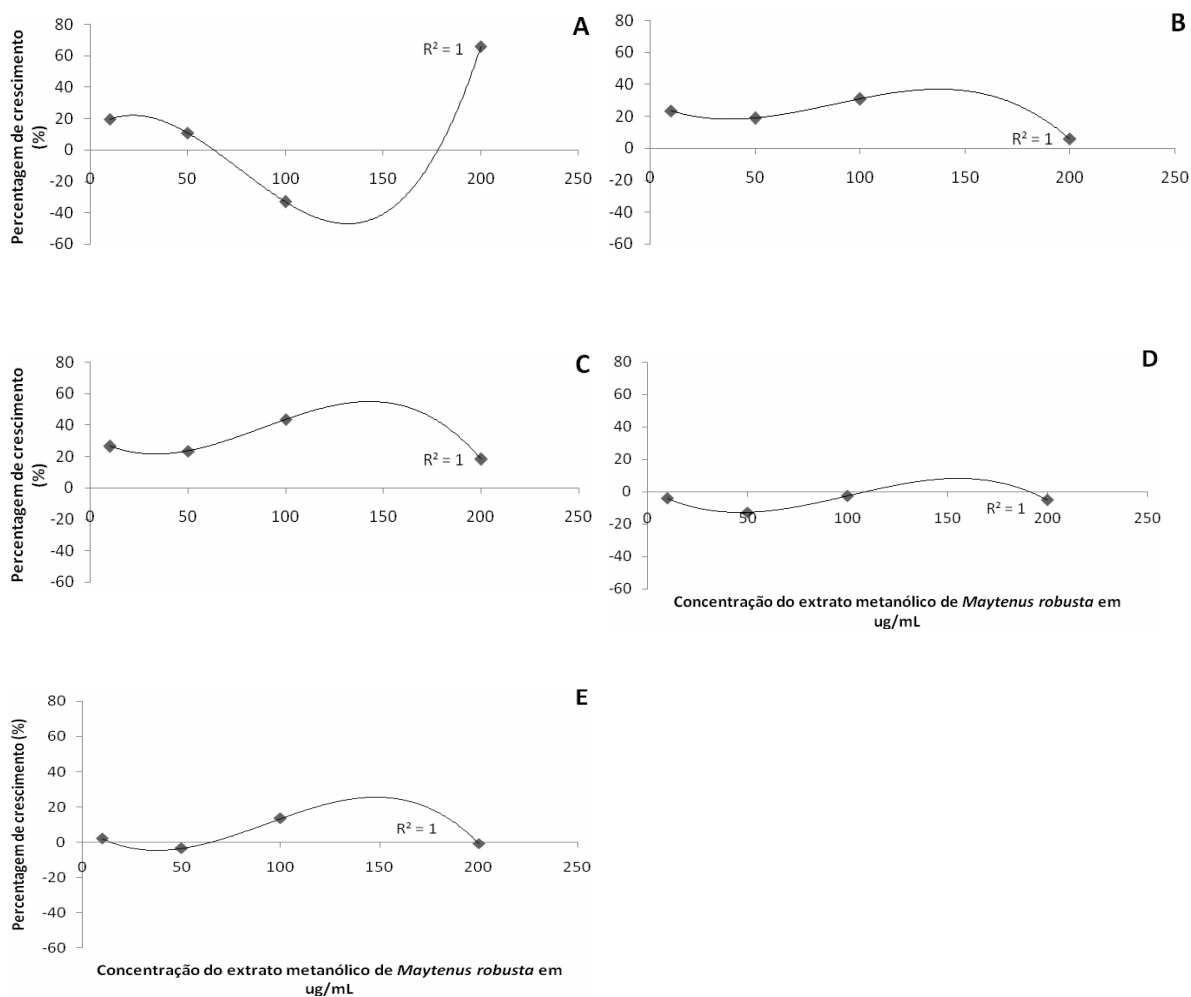
concomitantemente com o mitógeno. O controle positivo apresentou percentagem de crescimento de 22,8% e, em comparação a este, todas as concentrações do extrato incubado isoladamente ($p=0,029$) e as concentrações de 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$ simultaneamente ao mitógeno ($p=0,049$), mostraram inibição significativa da proliferação celular. Esta inibição da proliferação celular poderia ser interpretada como citotoxicidade, contudo os demais achados em 72 horas não condizem com esta interpretação.



C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); * $p < 0,05$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 18. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico *pokeweed mitogen* (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO_2 frente a extrato metanólico *Maytenus robusta*.

O extrato metanólico de *Maytenus robusta* demonstrou não ter efeito dose-resposta (Figura 19), mesmo com diferença significativa em 144 horas para o extrato isolado, a atividade inibitória observada não foi dose dependente.



R^2 : coeficiente de determinação. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 19. Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de *Maytenus robusta* incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao *pokeweed mitogen* a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO_2 durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).

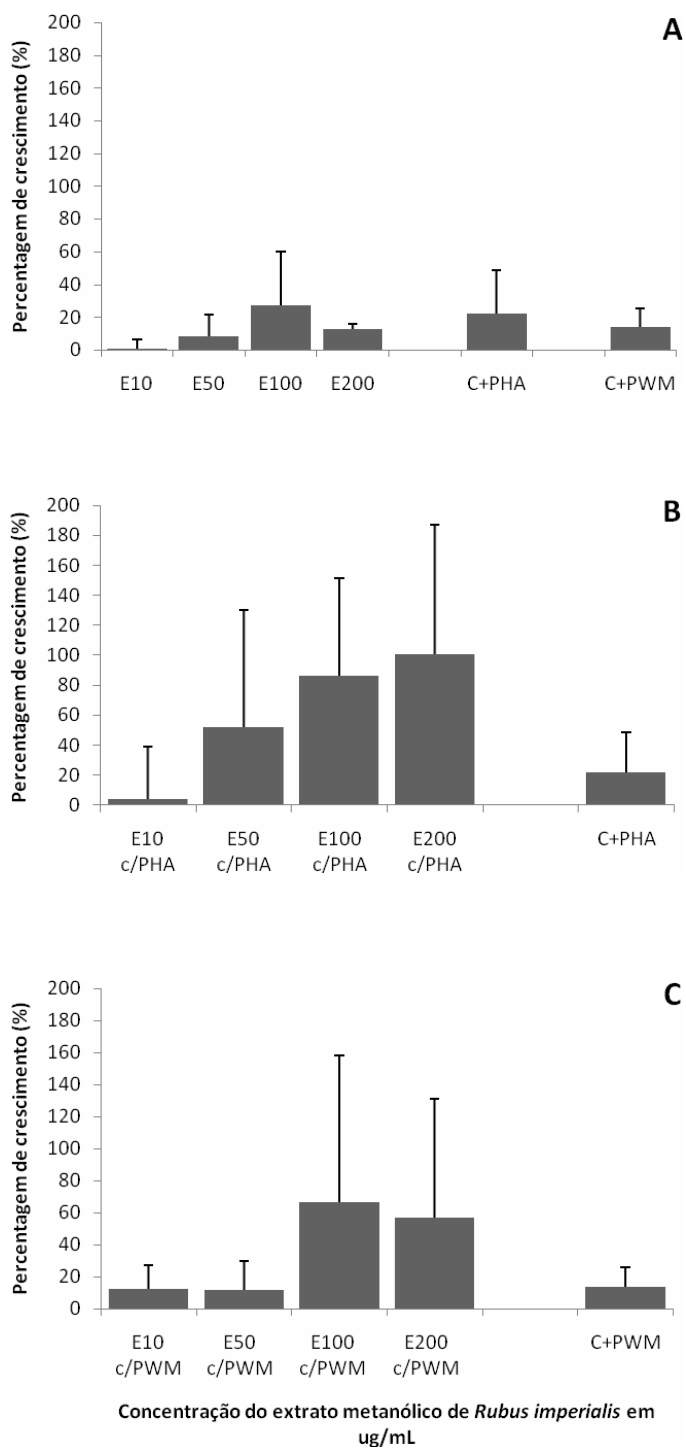
A *Maytenus robusta* possui triterpenos e compostos fenólicos semelhantes a *Maytenus ilicifolia*, conhecida como “espinheira-santa” e usada popularmente no tratamento de úlceras (NIERO et al., 2001; JORGE et al., 2004), e com importantes propriedades biológicas, como atividade citotóxica, antibacteriana e anti-ulcerogênica (OLIVEIRA et al., 1991; CARLINI, 1988; SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; ZHU, 1998). O triterpeno friedelina parece ser o principal componente responsável pela ação anti-ulcerogênica e contra gastrite desta planta (PEREIRA et al., 1992).

Este triterpeno friedelina, obtido da casca de *Quercus suber* (MOITEIRO et al., 2001) e das folhas da *Justicia gendarussa* (AROKIYARAJ et al., 2007), provou inibição da proliferação de linfócitos humanos. Como este triterpeno sabidamente está presente na *Maytenus robusta*, pode ser aqui inferido que este composto é predominante sobre os demais na ação sobre as células mononucleares mantidas em cultivo durante o teste de linfoproliferação.

5.5 *Rubus imperialis*

O extrato metanólico de *Rubus imperialis* nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL avaliado pelo teste de proliferação linfocitária, isoladamente ou frente ao mitógeno PHA e PWM, tem os resultados apresentados nas Figuras 20 e 21 representando a percentagem média de crescimento de quatro experimentos realizados em triplicatas. O extrato incubado isoladamente com as células durante 72 horas (Figura 20A) mostrou percentagem de crescimento média de 0,7 a 27,3%, com maior crescimento a 100 µg/mL. Quando incubado simultaneamente com estímulo da PHA (Figura 20B) a percentagem de crescimento variou de 4,0 a 100,8% com maior crescimento a 200 µg/mL e com estímulo do PWM (Figura 20C) apresentou crescimento variando de 11,8 a 66,8% com maior crescimento a 100 µg/mL.

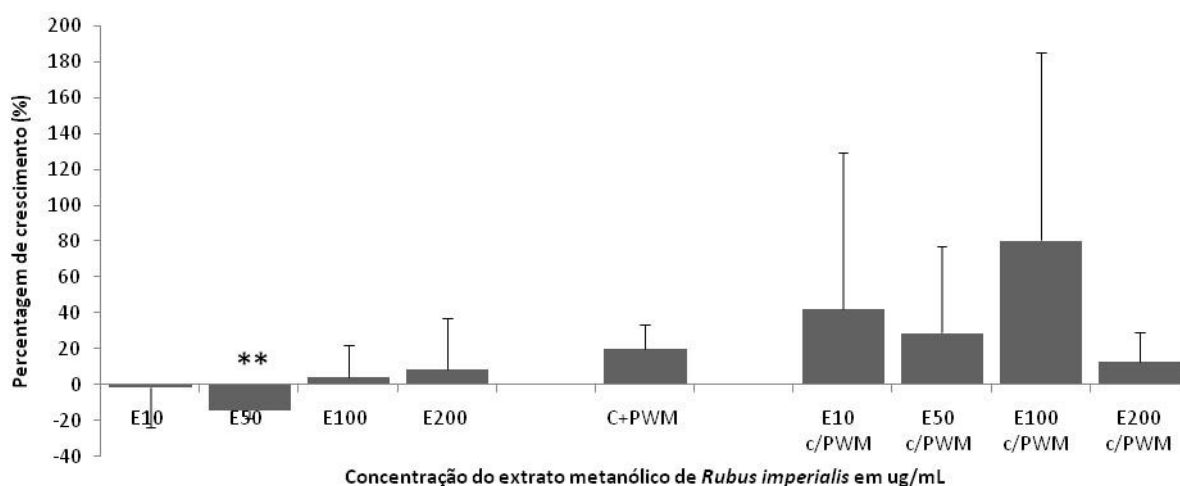
Considerando a percentagem de crescimento obtida no controle positivo PWM (13,7%) e PHA (21,9%), a análise estatística não mostrou indução significativa da proliferação celular, tanto para extrato incubado isolado quanto para o extrato incubado junto aos mitógenos PHA ($p \geq 0,057$) e PWM ($p \geq 0,143$). O elevado desvio padrão obtido na avaliação do extrato simultâneo à PHA impossibilitou a detecção do estímulo na proliferação dos linfócitos T, que graficamente representa uma potencialização do efeito da PHA.



C+ PHA: controle positivo com fitohemaglutinina (PHA); C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM). Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 20. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/mL) e *pokeweed mitogen* (PWM, 5 µg/mL) em incubação de 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂ frente a extrato metanólico *Rubus imperialis*.

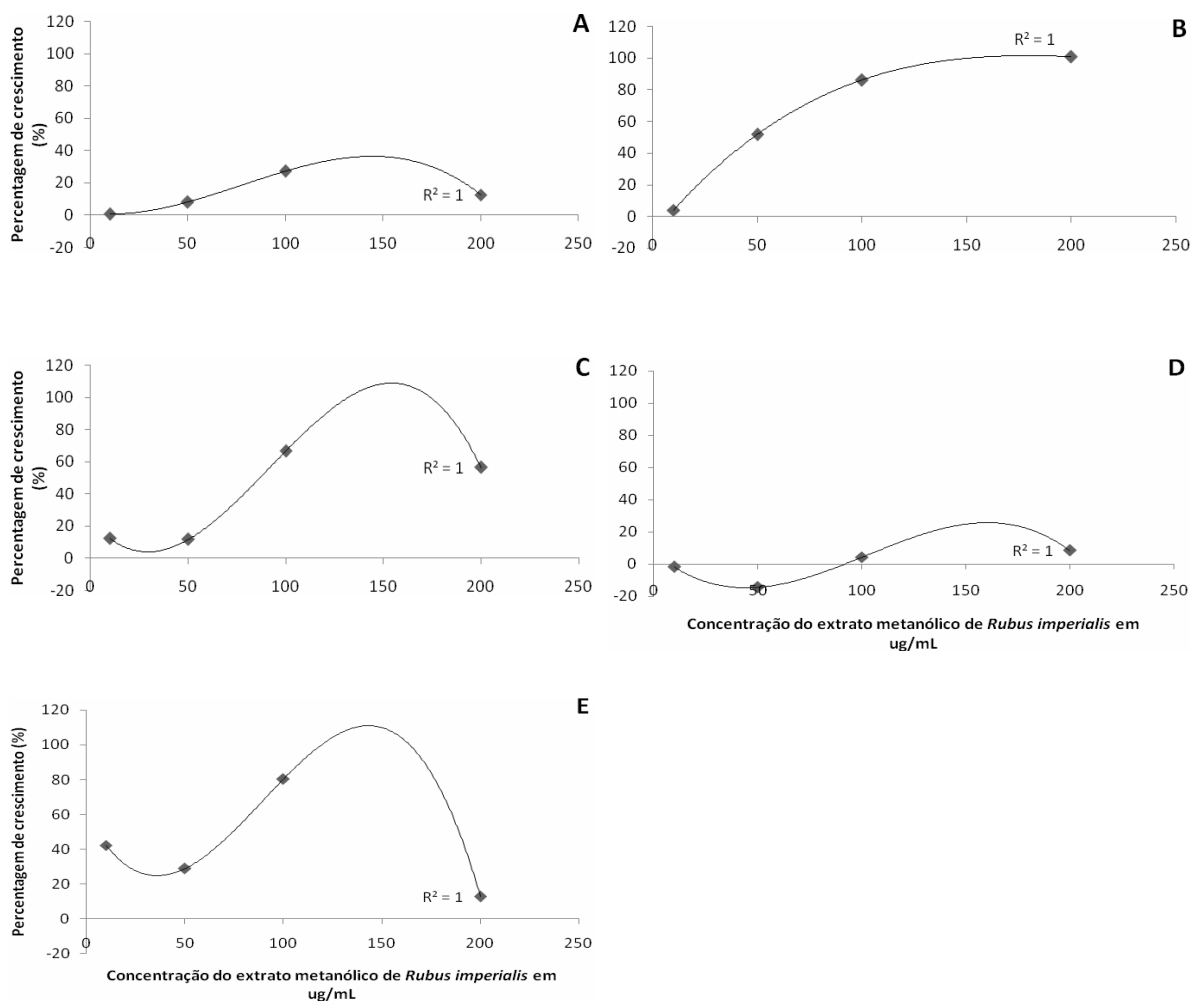
O cultivo celular em incubação de 144 horas (Figura 21) mostrou indução na proliferação celular de -14,3 a 8,5% quando incubado extrato isoladamente, e de 12,8 a 80,4% quando incubado junto ao PWM. Considerando estes crescimentos celulares e o crescimento obtido no controle positivo (20,2%), a análise estatística mostrou haver significância somente quando incubado isoladamente na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, neste caso com inibição do crescimento celular ($p=0,008$).



C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM); ** $p<0,01$ em comparação ao C+ PWM. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 21. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em porcentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico *pokeweed mitogen* (PWM, 5 $\mu\text{g/mL}$) em incubação de 144 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 frente a extrato metanólico *Rubus imperialis*.

O extrato metanólico de *Rubus imperialis* demonstrou não ter efeito dose-resposta (Figura 22), apenas sugere tendência a ter efeito dose-resposta em concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$. Outro achado importante e que não pode ser confirmado devido ao elevado desvio padrão foi a potencialização do efeito da PHA em 72 horas, cujo efeito mostra ser dose-dependente (Figura 22B).



R^2 : coeficiente de determinação. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 22. Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de *Rubus imperialis* incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao pokeweed mitogen a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO_2 durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).

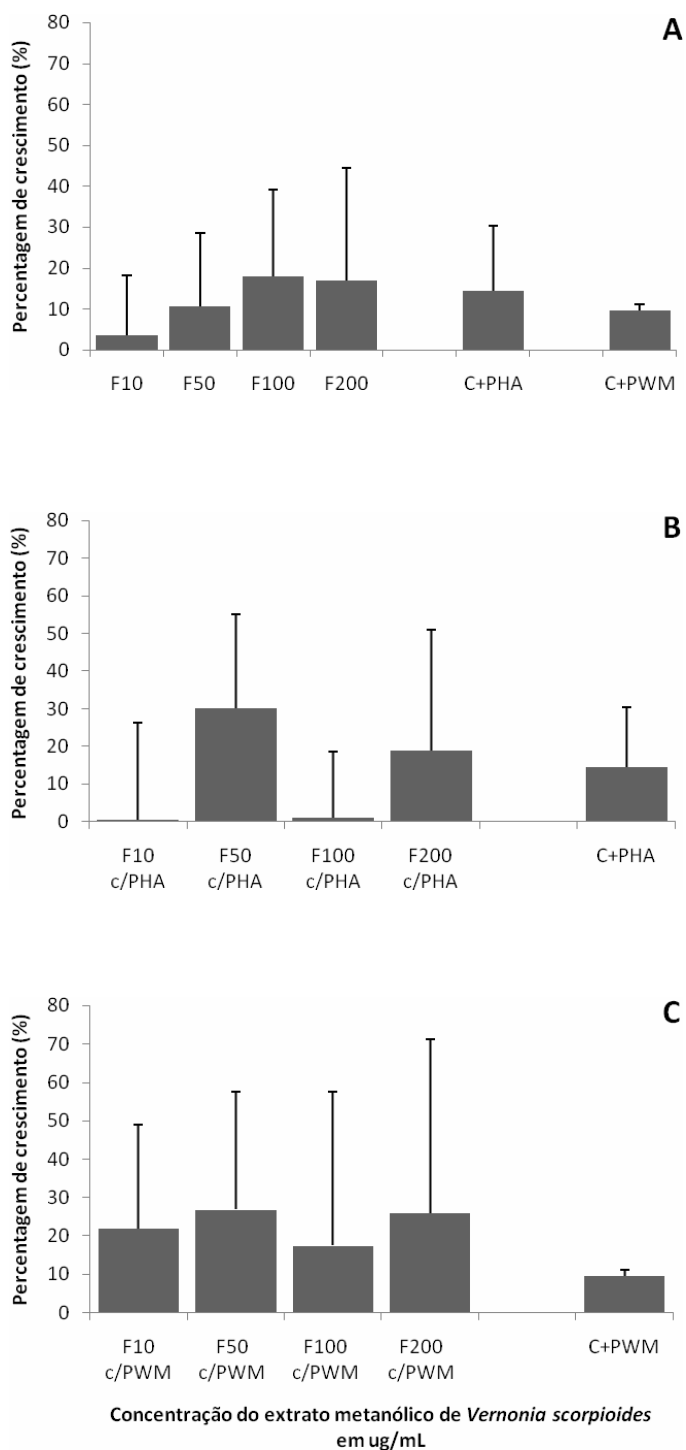
A planta *Rubus imperialis* apresenta constituintes como o triterpeno nigaichigosídeo F-1, ácido tormêntico e ácido 23-hidroxi-tormêntico (NIERO et al., 1999). Embora não tenham sido encontrados resultados significativos para o extrato metanólico de *Rubus imperialis* e não tenham sido avaliados os triterpenos enquanto compostos isolados no cultivo celular, os resultados indicam que pode haver presença de outros compostos com atividade sobre as células estudadas.

Um exemplo da diversidade de resultados passíveis de serem obtidos em modelos de estudos de atividade biológica foi a identificação da atividade citotóxica da fração acetato de etila das raízes desta espécie frente à *Artemia salina* e que, ao estudar o triterpeno Niga-ichigosídeo F1 desta fração não apresentou a mesma ação. Como sugerido pelos autores, pode haver a existência de outros compostos responsáveis pela atividade observada, ou ainda, haver sinergismo entre mais de um princípio ativo (KANEGUSUKU, 2001).

5.6 *Vernonia scorpioides*

Figuras 23 e 24 apresentam os resultados obtidos com o extrato metanólico de nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 µg/mL, em incubação isolada ou simultânea aos mitógenos, representando a percentagem média de crescimento de quatro experimentos realizados em triplicatas. As células mononucleares humanas incubadas isoladamente com o extrato por período de 72 horas mostraram percentagem de crescimento média de 3,7 a 17,9%, com maior crescimento a 100 µg/mL (Figura 23A). Quando o extrato foi incubado simultaneamente aos mitógenos, a percentagem de crescimento foi de 0,5 a 30,1% para PHA (Figura 23B) e de 17,5 a 26,8% para PWM (Figura 23C), ambos com maior crescimento a 50 µg/mL.

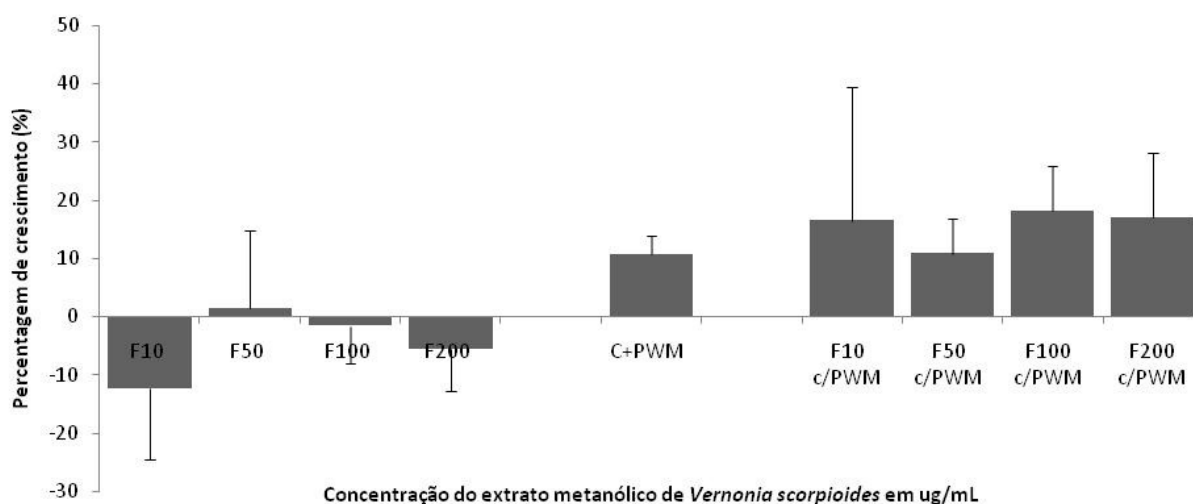
A indução do crescimento celular não foi significativamente superior aos controles positivos em nenhuma das condições de cultivo frente aos controles positivos PHA (14,4%) e PWM (9,6%), ambos com valores de $p \geq 0,247$. Ainda, a representação gráfica demonstra que mesmo uma menor variabilidade nos resultados, refletida no desvio padrão, não mostraria significância nos resultados obtidos.



C+ PHA: controle positivo com fitohemaglutinina (PHA); C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM). Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 23. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico fitohemaglutinina (PHA, $5 \mu\text{g/mL}$) e *pokeweed mitogen* (PWM, $5 \mu\text{g/mL}$) em incubação de 72 horas a 37°C e 5% de CO_2 frente a extrato metanólico *Vernonia scorpioides*.

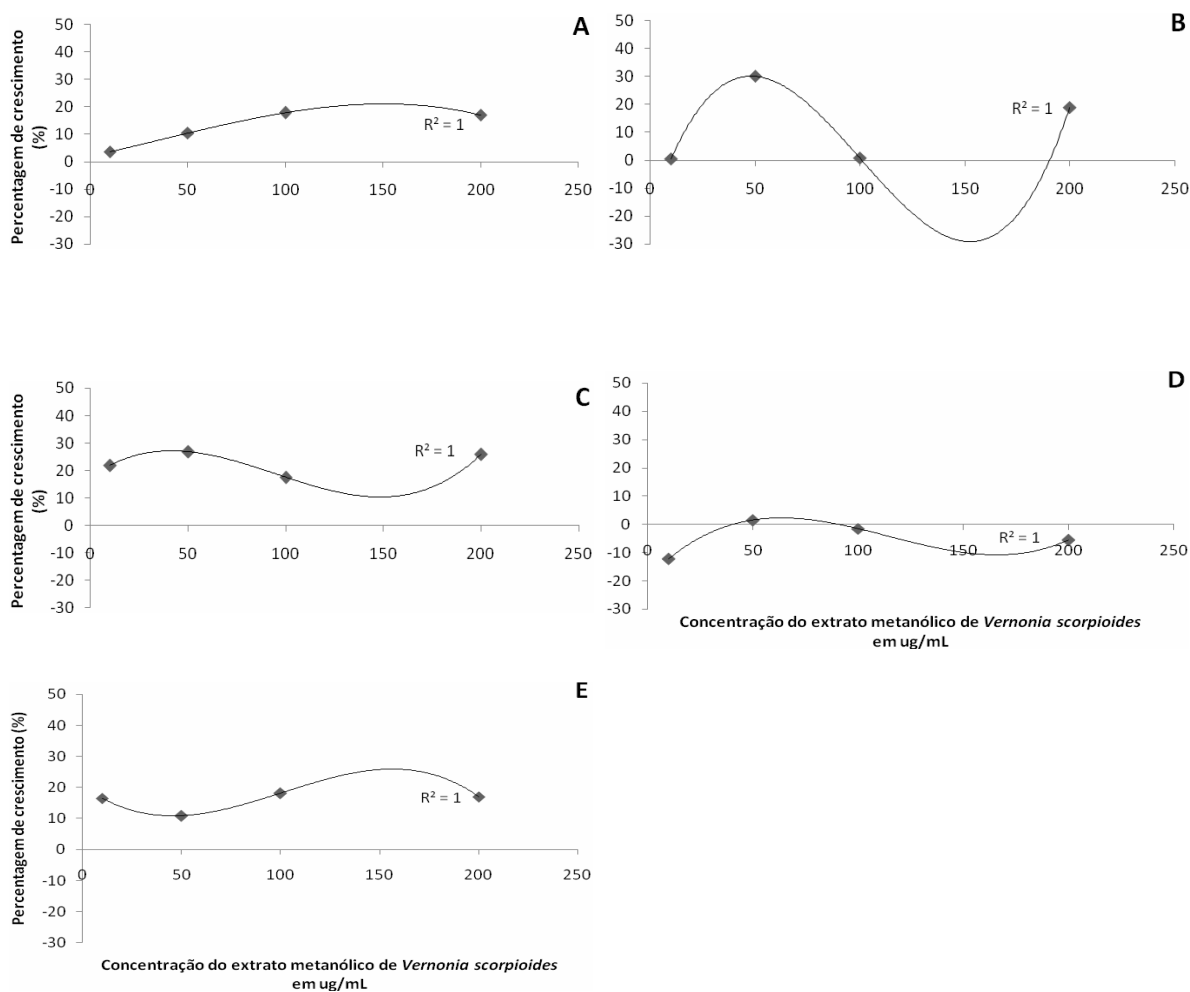
A percentagem de crescimento obtida no teste de linfoproliferação em período de incubação de 144 horas foi de -12,3 a 1,5% quando incubado extrato isolado no cultivo celular, e de 10,8 a 18,1% quando incubado junto ao mitógeno PWM (Figura 24). A análise estatística mostrou não haver diferença significativa em nenhuma das condições apresentadas frente ao controle positivo PWM (10,7%), embora as concentrações do extrato isolado a 10, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tenham mostrado inibição da proliferação celular quando o extrato foi incubado isoladamente no cultivo celular ($p \geq 0,100$).



C+ PWM: controle positivo com *pokeweed mitogen* (PWM). Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 24. Avaliação da proliferação de células mononucleares humanas, em percentagem de crescimento, na presença e na ausência de estímulo mitogênico *pokeweed mitogen* (PWM, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em incubação de 144 horas a 37 °C e 5% de CO_2 frente a extrato metanólico *Vernonia scorpioides*.

A Figura 25 apresenta as curvas de crescimento obtidas a partir da linha de tendência polinomial na ordem 3, com valor $R^2=1,0$, demonstrando que o extrato metanólico de *Vernonia scorpioides* demonstrou que não apresenta efeito dose-resposta.



R^2 : coeficiente de determinação. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de quatro experimentos realizados em triplicata.

Figura 25. Curva dose-resposta do efeito do extrato metanólico de *Vernonia scorpioides* incubado isolado (A e D) ou simultaneamente à fitohemaglutinina a 5 $\mu\text{g/mL}$ (B) e ao *pokeweed mitogen* a 5 $\mu\text{g/mL}$ (C e E) no ensaio de proliferação com células mononucleares humanas a 37 °C e 5% CO_2 durante 72 horas (A, B e C) e 144 horas (D e E).

Recentemente, Buskühl (2007) isolou a partir da fração diclorometano de *Vernonia scorpioides*, as lactonas sesquiterpênicas poliacetileno, hirsutinolídeo e cafeato de etila, além de uma mistura de lactonas sesquiterpênicas do tipo hirsutinolídeo e glaucolídeo.

A fração diclorometano desta espécie de planta aumentou o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos portadores do tumor

ascítico de Ehrlich, inibindo totalmente o desenvolvimento de tumor (PAGNO et al., 2006). Recentemente foi relatada a atividade citotóxica das lactonas sesquiterpênicas e do poliacetileno obtido a partir da fração diclorometano da *Vernonia scorpioides* sobre células tumorais Hela, com indução de apoptose e aumento na expressão de caspase 3 deste último composto (BUSKÜHL, 2007).

O fato do teste de linfoproliferação não apresentar significância nos resultados obtidos no presente estudo, somado à importância da atividade antitumoral e indutora de apoptose dos compostos desta planta, sugerem a necessidade de continuidade nos estudos, para verificar se em células de cultivo primário e do sistema imune adaptativo estes compostos apresentam esta mesma atividade citotóxica.

O presente trabalho representa um estudo pioneiro quanto à ação dos extratos metanólicos obtidos de seis plantas medicinais da flora catarinense, na proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com PHA e PWM. Por conta disto, foram observados vários efeitos sobre a linfoproliferação dependendo da planta estudada, variação esta que pode ser atribuída a diversos fatores, tais como, composição química dos extratos, sinergismo de moléculas presentes no extrato metanólico, cultivo primário de células obtidas de indivíduos diferentes, entre outros.

Estudos avaliando as frações, a fim de identificar os possíveis compostos responsáveis pelo efeito inibidor ou estimulante na proliferação celular devem ter continuidade, para que as ferramentas que combatem as patologias que acometem o sistema imune possam ser ampliadas. Dentre as plantas aqui estudadas, a *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* e *Matayba elaeagnoides* apresentaram resultados que justificam a continuidade dos estudos, devido à ativação dos linfócitos T.

6 CONCLUSÕES

- A combinação dos resultados obtidos no teste de linfoproliferação em 72 e 144 horas sugerem indução na proliferação linfócitos T, sem interferência na ativação dos linfócitos B para os extratos metanólicos de *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* e *Matayba elaeagnoides*.
- O extrato metanólico de *Maytenus robusta* mostrou resultados relevantes somente quando incubado por 144 horas, com inibição da proliferação celular.
- O teste de linfoproliferação sugere ainda que os extratos metanólicos de *Rubus imperialis* e *Vernonia scorpioides* não tem ação sobre a proliferação dos linfócitos T e B, pois em nenhuma das condições de cultivo foram obtidos resultados com significância estatística.
- O extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* demonstrou maior atividade imunoestimulatória, 3 vezes maior que o extrato de *Calophyllum brasiliensis* quando incubado isolado e 3,6 vezes maior quando incubado simultâneo a PHA. Comparado ao extrato de *Matayba elaeagnoides*, o estímulo foi 1,5 vezes maior quando incubado isolado, mas praticamente sem diferença quando incubado junto à PHA.
- O extrato metanólico de *Matayba elaeagnoides* mostrou atividade imunoestimulatória intermediária sobre a proliferação das células mononucleares humanas, com estímulo 2 vezes maior que o extrato de *Calophyllum brasiliensis* quando incubado isolado e 3,3 vezes maior quando incubado simultâneo à PHA.
- A *Calophyllum brasiliensis*, *Ipomoea pes-caprae* e *Matayba elaeagnoides* apresentaram resultados imunoestimulatórios que justificam a continuidade dos estudos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. N. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354 p.
- ABE, F.; NAGAFUGI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUNIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal Constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 27, p. 141-143, 2004.
- ABOSI, A. O.; RASEROKA, B. H. *In vivo* antimalarial activity of *Vernonia amygdalina*. **Br. J. Biomed. Sci.**, London, v. 60, p. 89-91, 2003.
- AGARWALL, S.S; SINGH, V. K. Immunomodulators: a review of studies on Indian medicinal plants and syntetic peptides: Part I. Medicinal plants. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, New Delhi, v. 65, p. 179-204, 1999.
- ALONSO, R.; CADAVID, I.; CALLEJA, J. M. A preliminary study of hipoglicemic activity of *Rubus fruticosus*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 46, p. 102-106, 1980.
- AROKIYARAJ, S.; PERINBAM, K.; AGASTIAN, P.; BALARAJU, K. Immunosuppressive effect of medicinal plants of Kolli hills on mitogen-stimulated proliferation of the human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. **Indian J. Pharmacol.**, Mumbai, v. 39, n. 4, p. 180-183, 2007.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul: As principais espécies nativas sul-brasileiras**. Instituto Souza Cruz. 2002.
- BENADIK, P. **IPOMOEIA PES-CAPRAE (L.) R. Br. – povíjnice**. 2007. Disponível em: <http://botany.cz/cs/ipomoea-pes-caprae/>>. Acesso em: 15 abr. 2008.
- BESSLER, H.; SALMAN, H.; BERGMAN, M.; STRAUSSBERG, R.; DIALDETTI, M. *In vitro* effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. **Clin. Immunol.**, Los Angeles, v. 117, p. 73-77, 2005,
- BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.E. **Plantas aquáticas e palustres do Estado de São Paulo**. Jan. 2004. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/plant-aq-SP/img/plantas/Vernonia_scorpoides.html>. Acesso em: 15 abr. 2008.
- BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, Oslo, v. 97, p. 7, 1968.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n.196, de 10 de out. de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.201, 16 de out. 1996. Seção 1, p. 21082-21085. [Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos].
- BRASILEIRO, B. G.; PIZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants

used in Governador Valadares district. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.

BREHMER, J.S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de ehrlich**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BREKHMANN, I. I.; DURDYMOV, I. V. New substances of plant origin which increase non-specific resistance. **Ann. Rev. Pharmac.**, Palo Alto, v. 9, p. 419-430, 1969.

BROCHADO, C. O.; DE ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **J. Braz. Chem. Soc.**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.

BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, R.; LIVRAMENTO, J. A.; ÁVILA, L. M.; FERREIRA, W. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 126, p. 104-110, 2001.

BUFFON, D. E. **Isolamento e identificação de princípios ativos de *Calophyllum brasiliense* Camb. (CLUSIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BUSKÜHL, H. **Avaliação *in vitro* do mecanismo de ação citotóxico de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

CABRERA, A. L.; KLEIN R, M. Compostas: Tribo: Vernoniae. *Fl Illustr Catarin* 1980; 3: 354-355.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 297-315.

CAMPOS, M.; OROPEZA, M.; PONCE, H.; FERNANDEZ, J.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; TORRES, H.; REYES-CHILPA, R. Relaxation of uterine and aortic smooth muscle by glaucolídes D and E from *Vernonia liatroides*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 26, p. 112-115, 2003.

CARLINI, E. L. A. **Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa) e outras**. CEME/AFIP, Brasília, DF, Brasil, 1988.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre

modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, Rosendo Augusto; CALIXTO, João Batista (orgs.). **Plantas Mediciniais sob a ótica da moderna Química Medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 49-53.

COELHO, F.; FERREIRA, J. **Efeito proliferativo dos extratos de *Ipomoea pes-caprae* e *Rubus imperialis* em células do baço de camundongos estimuladas com fitohemaglutinina**. Itajaí 2007. Monografia. Curso de Farmácia - Universidade do Vale do Itajaí.

COELHO, F.; FERREIRA, J.; ZANDONAI, R. H.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; BUENO, E. C. Proliferative activity of *Ipomoea pes-caprae* and *Rubus imperialis* methanolic extracts on lymphoblastogenesis assay using murine spleen cells stimulated with phytohemagglutinin. In: INTERNATIONAL CONGRESSO F PHARMACEUTICAL SCIENCES, 6., Ribeirão Preto, **Anais**. Ribeirão Preto: CIFARP, 2007.

COTTIGLIA F.; DHANAPAL B.; STICHER O.; HEILMANN J. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 67, p.537-541, 2004.

CRAGG, G. M.; BOYD, M.R.; KHANNA, R.; KNELLER, R.; MAYS, T. D.; MAZAN, K. D.; NEWMAN, D. J.. International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. **Pure Appl. Chem.**, Sausville, v. 71, p.1619-1633, 1999.

DALAZEN, P.; MOLON, A.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Braz. Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 15, n. 2, p. 82-87, 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 89, p. 271-277, 1986.

DUARTE, B. M.; VIEIRA, C. S. **Padronização do teste de proliferação linfocitária humana com fitohemaglutinina e avaliação do efeito imunomodulador dos extratos de *Rubus imperialis* e *Ipomoea pes-caprae***. Itajaí 2007. Monografia. Curso de Farmácia - Universidade do Vale do Itajaí.

EMENDORFER, F.; EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V. F.; NIERO, R.; CECHINEL-FOLHO, V. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, Edmonton, v. 8, p. 81-86, 2005.

FREIRE, M. F. I.; ABREU, H. S.; CRUZ, L. C. H.; FREIRE, R. B. Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Microbiology**, Reading, v. 27, p. 1-6, 1996.

GASPAROTTO Jr., A.; MISLAINE, B. A.; IZABEL, C. P.; CORTEZ, A. G.; NAKAMURA, C. V.; PRADO, D. B.; RODRIGUES, E.; FERREIRA, A. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliensis*. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 8, p. 575-578, 2005.

GOMEZ-FLORES, R.; VERÁSTEGUI-RODRÍGUES, L.; QUINTANILLA-LICEA, R.; TAMEZ-GUERRA, P.; TAMEZ-GUERRA, R.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C. *In vitro* rat lymphocyte proliferation induced by *Ocinum basilicum*, *Persea americana*, *Plantago virginica*, and *Rosa spp.* Extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nigéria, v. 2, p. 05-10, 2008.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P.K.; ROY, S. Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.17, p. 804-806, 2003.

HENRY, J. B. **Diagnóstcos Clínicos e Tratamento pó Métodos Laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. 1552 p.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EDUFSCar, 2003.152 p.

HOWARD, M.; GARRA, A.; ISHIDA, H. Biological properties of interleukin 10. **Clin. Immunol.**, Los Angeles, v. 12, p. 239-247, 1992.

HUANG, Y.; DING, Z. H.; LIU, J. K. A new highly oxygenated flavone from *Vernonia saligna*. **Z. Naturforsch.**, Munich, v. 58, p. 347-350, 2003.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M.D.C.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 27, p. 1471-1475, 2004.

ISAIAS, D.E.; NIERO, R.; NOLDIN, V.F.; DE CAMPOS-BUZZI, F.; YUNES, R.A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). **Pharmazie**, Berlin, v. 59, p. 879-881, 2004.

ISHIZUKA, M.; KAWATSU, M.; YAMASHITA, T.; UENO, M.; TAKEUCHI, T. Low molecular weight immunomodulators produced by microorganisms. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v. 17, p. 133-139, 1995.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y, RAO, K. S.; TAKAYASU, J.; OKUDA, Y.; MUKAINAKA, T.; TOZUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. A new biflavonoide from *Callophyllum paniciflorum* with antitumor-promoting activity. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 62, p. 1668-16671, 1999.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y; CECHINEL FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. structureof three new coumarins and cancer chempreventive activityof 4-substituted coumarins. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 66, n. 3, p. 368-371, 2003.

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.**, Lausanne, v. 86, p. 229-234, 2003.

IZEVBIGIE, E. B.; BRYANT, J. L.; WALKER, A. A novel natural inhibitor of extracellular signal-regulated kinases and human breast cancer cell growth. **Exp. Biol. Med.**, Maywood, v. 229, p.163-169, 2004.

JORGE, L. L. F; MARKMAN B. E. D. Caracterização histológica das folhas e frutos de *Rubus rosaefolius* Smith. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, p. 1-4,1993.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

KANEGUSUKU, M. **Análise fitoquímica e biológica das raízes de *Rubus imperialis***. Itajaí 2001. Monografia. Curso de Farmácia - Universidade do Vale do Itajaí.

KIMURA, S.; ITO, C.; JYOKO, N.; SEGAWA, H.; KURODA, J.; OKADA, M.; ADACHI, S.; NAKAHATA, T.; YUASA, T.; FILHO, V. C.; FURUKAWA, H.; MAEKAWA T. Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 113, p. 158-165, 2005.

KRISHNA KUMARI, G. N.; MASILAMANI, S.; GANESH, M. R.; ARAVIND, S.; SRIDHAR, S. R. Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from *Vernonia arborea*. **Fitoterapia**, Milan, v. 74, p. 479-482, 2003

KROGH, R.; KROTH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A. O.; SOUZA, M. M.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R. A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Pharmazie**, Berlin, v. 54, p. 464-466, 1999.

KUO, Y. H.; KUO, Y. J.; YU, A. S.; WU, M. D.; ONG, C. W.; KUO, L. M. Y; HUANG, J. T.; CHEN, C. F.; LI, S. Y. Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide-A and -B, from *Vernonia cinerea*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 51, p. 425-426, 2003.

LAMBERTINI, E.; PIVA, R.; KHAN, M. T.; LAMPRONTI, I.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R. Effects of extracts from Bangladeshi medicinal plants on in vitro proliferation of human breast cancer cell lines and expression of estrogen receptor alpha gene. **Int. J. Oncol.**, Athens, v.24, p. 419-423, 2004.

LEITE, S. N.; PALHANO, G.; ALMEIDA, S.; BIAVATTI, M. W. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, p. 496-500, 2002.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; DAVIS, H.; VAN-POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN-BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 49, p. 23-32, 1995.

LOCHER, C. P.; WITVROUW, M.; DE BÉTHUNE, M. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; DAVIS, H.; LASURE, A.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; VLIETINCK, A. J. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 2, p. 259-264, 1996.

LOPEZ, J. A.; LITTLE, E.; RITZ, G.; ROMBOLD, J.; HAHN, W. **Arboles comunes del Paraguay**. Paraguay: Cuerpo de Paz, 1987. 425 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 1. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium. 3. ed., 2000. 352 p.

LOZOYA, X. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. **Investigación y Ciencia**, Barcelona, v. 254, p. 4, 1997.

MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A.; MANOSROI, J. Immunomodulatory activities of *Clausena excavate* Burm. f. wood extracts. **J. Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, p. 155-160, 2003.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **J. Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 78, p. 133 - 137, 2001.

MAZUMDER, U. K.; GUPTA, M.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P. K.; ROY, S. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, p. 185-188, 2003.

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

MOITEIRO, C.; JUSTINO, F.; TAVARES, R.; MARCELO CURTO, M. J.; FLORENCIO, M. H.; NASCIMENTO, M. S.; PEDRO, M.; CERQUEIRA, F.; PINTO, M. M. Synthetic secofiedelane and fiedelane derivatives as inhibitors of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines in vitro. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 64, n. 10, p. 1273-1277, 2001.

MONTEIRO, M. H.; GOMES-CARNEIRO M. R.; FELZENSZWALB I.; CHAHOUD I.; PAUMGARTTEN F. J. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **J. Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, p. 149 - 157, 2001.

MONTELLI, T. C. B.; SOARES, A. M. V. C.; PERAÇOLI, M. T. S. Immunologic aspects of West syndrome and evidence of plasma inhibitory effects on T cell function. **Arq. Neuro-Psiq.**, São Paulo, v. 61, p. 731-737, 2003.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MYERS, R. L. **Immunology – a laboratory manual**. Dubuque: WCB Publishers, 1995.

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.**, Lausanne, v. 91, p. 141-152, 2004.

NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; SOUZA, M. M.; MONTANARI, J. L.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Antinociceptive activity of Niga-ichigoside F₁ from *Rubus imperialis*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 62, n. 8, p. 1145-1146, 1999.

NIERO, R.; MOSER, R.; BUSATO, A. C. B.; YUNES, R. A.; REIS, A.; CECHINEL-FILHO, V. A comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). **Z. Naturforsch.**, Munich, v. 56, p. 158-161, 2001.

NIERO, R.; KANEGUSUKU, M.; SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive action of extracts and fractions from *Rubus imperialis* (Rosaceae). **Thérapie**, Paris, v. 57. n. 3, p. 242-245, 2002.

OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 34, p. 29-41, 1991.

OLIVEIRA, J. C.; MORETO, D. R.; MARTINS, D. T. O. Propriedades farmacológicas gerais da *Calophyllum brasiliense* Camb. (Guarandi). In: XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Florianópolis, Brasil, 1999.

PAGNO, T.; BLIND, L. Z.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. O. Cytotoxic activity of the dchloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 11, p. 1483-1491, 2006.

PANDIMA DEVI, K.; SAI RAM, M.; SREEPRIYA, M; ILAVAZHAGAN, G.; DEVAKI, T. Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induced toxicity in splenic lymphocytes – an *in vitro* study. **Biomed. Pharmacother.**, New York, v. 57, p. 105-108, 2003.

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

PATEL A. V.; ROJAS-VERA J.; DACKE C. G. Therapeutic Constituents and Actions of Rubus Species. **Curr. Med. Chem.**, Sharjah, v. 11, n. 11, p. 1501-1512, June 2004.

PATWARDHAN, B.; KALBAG, D.; PATKI, P. S.; NAGSAMPAGI, B. A. Search of immunomodulatory agents: a review. **Indian Drugs**, New Delhi, v. 28, n. 2, p. 348-358, 1990.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 1502 p.

PENINGTON, T. D.; SARUKHAN, J. **Manual para la Identificación de Campo de los Principales Árboles Tropicales de México**. México: Inst. Nac. de Investigações Florestales. 2. ed., 1998. 413 p.

PEREIRA, A. M. S.; RODRIGUES, D. C., CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Isolamento de metabólitos de *Maytenus* associados à ação anti-úlceras gástrica. **XII Simpósio de Plantas Mediciniais Brasileiras**. Anais, p. 55. UFPR, Curitiba, Brasil, 1992.

PEREYRA, M. L. G.; CARIDDI, L. N.; YBARRA, F.; ISOLA, M. C., DEMO, M. S., SABINI, L.; MALDONADO, A. M. Immunomodulating properties of *Mintostachys verticillata* on human lymphocytes and basophils. **Rev. Alerg. Méx.**, Naucalpan, v. 52, 2005.

PETTIT, G. R. Progress in the discovery biosynthetic anticancer drugs. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 59, p. 812-821, 1996.

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

PLAEGER, S. F. Guest Commentary. Clinical Immunology and Traditional Herbal Medicines. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 10, n. 3, p. 337-338, 2003.

PONGAPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, I. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 58, p. 19-21, 1992.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; WASUWAT, S. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.35, p. 65-9, 1991.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

REEVES, G.; TODD, I. **Lectures notes on immunology**. Oxford: Blackwell Science, 2000.

RIBEIRO, A., Identificadas 124 plantas medicinais somente na região da Floresta Nacional. **Caçador: Informe Empresarial**. 12 de abr. 2004. Geral, p.6.

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ALVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of *sangre de drago* (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 69, n. 9, p. 785-794, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; WARRS, E.T. **Farmacognosia e Biotecnologia**. Colômbia: Premeir, 1997.

ROCHA, K. C.; GORESCU, R. A. G.; BELTRAME, R. L. 2007. Metodologia laboratorial para estudo da resposta imune celular. In: VAZ, A. J.; KIOKO, T.; BUENO, E. C. Imunoensaios: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. São Paulo: Manole, 443 p, 2003.

ROSE, B. A. **Espinheira Santa**. 1997. Jardim das Flores. Disponível no endereço eletrônico: <[http:// www.jardimdeflores.com.br](http://www.jardimdeflores.com.br)>. Acesso em: 15 dez. 2005.

ROSEGHINI, R.; MOREIRA, P.; VALE, V.; PINHEIRO, A. M.; COSTA, J. F.; BITTENCOURT, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; VELOZO, E.; EL-BACHÁ, R.; MEYER, R.; FREIRE, S. Different effects of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela bahiensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, London, v.28, p. 361-376, 2006.

SARTORI, N. T.; CANEPELLE, D.; DE SOUZA, P. T.; MARTINS, D. T. O. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb on experimental gastric lesions in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 67, p. 149-156, 1999.

SEGALEN, J. J. **Ipomoea pes-caprae**. 2007. Disponível em:< http://www.exot-nutz-zier.de/images/prod_images/ipomoea_pes_caprae.jpg>. Acesso em: 15 abr. 2008.

SHIMODA, H.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Immunomodulatory activities of thunberginol A and related compounds on lymphocyte proliferation. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 21, p. 809-813, 1998.

SILVA, C. V.; DUARTE, B. M.; FELIPPE, M. E.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; BUENO, E. C. human lymphoproliferation assay standardization using phytohemagglutinin and evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomoea pes-caprae* and *Rubus imperialis* methanolic extracts. In: CIFARP - International Congress of Pharmaceutical Sciences, 6, Ribeirão Preto, 2007. **Anais**. Ribeirão Preto, 2007.

SILVA, K. L.; SANTOS, A. R. S.; MATTOS, P. E. O.; YUNES, R. A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliensis*. **Therapie**, v. 56, p. 431-434, 2001.

SILVA, M. G.; OHARA, M. T.; KATO, E. T. M.; MAIA, J. G. F.; ANDRADE, E. H. de; YOSHIDA, M. Estudo farmacognóstico de *Myrciaria glomerata* In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 16, Recife, 2000. **Anais**. Recife, 2000. p. 172.

SILVA, T. M. A.; AOYAMA, H.; HAUM, M.; FERREIRA, C. V. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 237-239, 2004.

SIMÕES, C. M. O. Implementação do serviço de informações sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos junto ao Centro de informações

toxicológicas de Santa Catarina – CIT/HU/UFSC, 4ª **Semana de Ensino, pesquisa e extensão (SEPEX)**, Florianópolis, 2000.

SOUZA, M. M.; SCHLEMPER, V.; JESUS, R.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic profile of hidroalcoholic extract obtained from *Marruium vulgare*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 5, n. 2, p. 111-113, 1998.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea per-caprae* (L.) R. Br. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 6, p. 85-90, 2000.

SOUZA, M. T.; **Estudo Fitoquímico e Avaliação de Atividade Biológica de *Matayba elaeagnoides* RADLK**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajaí, 2006.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; QUEIROZ, A. B. R.; MARTINS FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Screening and Fractionation of Plant Extracts with Antiproliferative Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1207-1212, Dec. 2002.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G.; SILVEIRA FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 34, p. 21-27, 1991.

SRIWANTHANA, B.; TREESANGSRI, W.; BORIBOONTRAKUL, B.; NIUMSAKUL, S.; CHAVALITTUMRONG, P. *In vitro* effects of Thai medicinal plants on human lymphocyteactivity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, Hat Yai, v. 29, p. 17-28, 2007.

STITES, D. P.; TERR, A. I. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1992. 187 p.

SWANSTON-FLATT, S. K.; DAY, C.; BAILEY, C. J.; FLATT, P. R. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. **Diabetologia**, Berlin, v. 33, p. 462-464, 1990.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TCHINDA, A. T.; TANE, P.; AYAFOR, J. F.; CONNOLLY, J. D. Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, New York, v.63, p. 841-846, 2003.

TOIGO, L.; DE OLIVEIRA, R. F.; DE OLIVEIRA, F.; MARQUES, M. O. M. Morphological, anatomical, antimicrobial activity and essential oil fraction studies from *Vernonia Scorpioides* (Lam.) Pers. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 85, n.1, p.49-55, 2004.

UPADHYAY, S. N.; KAUSHIC, C.; TALWARG.P. Antifertility effects of neem oil by a single intra-uterine administration: a novel method for contraception. **Proc. R. Soc. Lond.**, London, v. 242, p.175-179, 1990.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **J. Pharm. Pharmacol.**, Belfast, v. 52, p. 253- 262, 2000.

VIEIRA, J. G. H. Evaluating Potential Pre-analytical and Methodological Interference Factors in Hormone Measurements. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 46, p. 9-15, 2002.

WAGNER, H. Pesquisa Fitomédica no Novo Milênio: Tendências e Mudanças. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a moderna Framacognosia**. Itajaí: Editora Univali, 2007. p. 35-47.

WAJNER, M.; SANTOS, K. D.; SCHLOTTFELDT, J. L.; ROCHA, M. P.; WANNMACHER, C. M. Inhibition of mitogen-activated proliferation of human peripheral lymphocytes *in vitro* by propionic acid. **Clin. Sci.**, Londres, v. 96, p. 99-103, 1999.

WIKIMEDIA FOUNDATION. **Calophyllum**. 2008. Disponível em:< <http://en.wikipedia.org/wiki/Calophyllum>>. Acesso em: 15 abr. 2008.

ZHU, N. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, New York, v. 47, p. 265-268, 1998.

ZANDONAI, R. H. **Cultura Celular: efeito do estrato metanólico de plantas medicinais sobre a proliferação de células esplênicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

ZONTA, C. M.; RUEDIGER, R. **Estudo experimental sobre o efeito hipoglicemiante da amora branca, *Rubus imperialis* Chum.Et.Schl.,Rosaceae**. Itajaí 1996. Monografia. Curso de Farmácia - Universidade do Vale do Itajaí.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)