



Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune

I.Z. Carlos^{1*}, F.C.M. Lopes¹, F.P. Benzatti¹, C.B.A. Carli¹, M.F. Marques¹, C.M. Jordão Junior², D. Rinaldo³, T.R. Calvo³, L.C. Santos³, W. Vilegas³

¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 502, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil,

²Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil,

³Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 355, 14801-970, Araraquara, SP, Brasil

RESUMO: Plantas têm contribuído no tratamento da maioria das doenças. Considerando a importância terapêutica das plantas medicinais, foi avaliada a atividade imunológica dos extratos metanólico e etanólico de *Davilla elliptica*. Macrófagos estão envolvidos em todos os estágios da resposta imune, podendo liberar componentes como: peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A estimulação dos macrófagos foi avaliada pela determinação de H₂O₂, NO e TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos na presença dos extratos da *D. elliptica*. IC₅₀ foi determinado através de ensaio utilizando MTT. Os estudos fitoquímicos realizados mostraram a presença de flavonóides derivados da quercetina e miricetina entre outros compostos. A produção de H₂O₂ não foi muito expressiva em ambos os extratos, contudo a de NO foi significativa. Os dois extratos induziram a produção de TNF- α , sendo que a liberação dessa citocina pelo extrato metanólico foi quase cinco vezes maior do que pelo extrato etanólico. Uma relação entre as sínteses de NO e TNF- α foi observada. O aumento na produção de NO está relacionado com a indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . Analisando os resultados, sugere-se que os extratos metanólico e etanólico de *D. elliptica* podem modular a ativação de macrófagos.

Unitermos: *Davilla elliptica*, macrófagos, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, fator de necrose tumoral- α .

ABSTRACT: "Action of *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) methanolic and ethanolic extracts in the immune response". Plants have contributed in a significant way to the treatment of most of the diseases. Considering the therapeutic importance of the medicinal plants, the immunological activity of the methanolic and ethanolic extract of *Davilla elliptica* was evaluated. In every stage of the immune response macrophages are involved and they can release many compounds such as hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Macrophages stimulation was evaluated by the determination of H₂O₂, NO and TNF- α in peritoneal macrophages cultures of mice in the presence of the *D. elliptica* extracts. IC₅₀ was determined by MTT assay. The phytochemical study showed flavonoids derived from quercetin and myricetin and other compounds. The production of H₂O₂ was not very expressive in both extracts, but they presented a significant effect on NO production. The two extracts induced TNF- α production, although the methanolic liberated almost five times more TNF- α than the ethanolic one. A relationship among the synthesis of NO and TNF- α was observed. The increase of NO production is related with the induction of proinflammatory cytokines like TNF- α . Analyzing the results, it is suggested that methanolic and ethanolic extract of *D. elliptica* can modulate macrophage activation.

Keywords: *Davilla elliptica*, macrophages, hydrogen peroxide, nitric oxide, tumor necrosis factor- α .

INTRODUÇÃO

Considerada em tempos remotos como uma manifestação divina, a utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria civilização (Yamada, 1998).

O potencial das plantas superiores como fonte de medicamentos é pouco explorado, estima-se a existência de 250.000-500.000 espécies de plantas no mundo, sendo que o estudo fitoquímico foi realizado em apenas uma

minúscula parcela (Hamburger; Hostettmann, 1991).

Muitas plantas usadas na medicina tradicional demonstraram modular a resposta imunológica (Agarwal; Singh, 1999). *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) é uma árvore pequena que cresce no cerrado do Brasil. Esta planta, conhecida como Cipó-caboclo e Pau-de-bugre, é utilizada como tônico, adstringente e laxante por populações locais (Rodrigues et al, 2002; Rodrigues; Carvalho, 2001).

Os macrófagos são as primeiras células a participar da resposta imunológica e podem ser ativados por uma variedade de estímulos. Sua principal função inclui a fagocitose de partículas estranhas, a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) (Johnston, 1988). Estudos recentes também sugerem que o H_2O_2 possui um importante papel nas funções do macrófago (Puri et al., 1993; Ramasarma, 1990). Os produtos do *burst* oxidativo são usados para matar patógenos fagocitados e para destruir outras células. Além do H_2O_2 e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), dois outros produtos altamente reativos derivados do oxigênio que participam do processo de destruição de patógenos são o radical hidroxila ($\cdot OH$) e oxigênio singlet (1O_2). Essa seqüência coordenada de reações bioquímicas é iniciada por um aumento no consumo de oxigênio, seguido da redução de um elétron do O_2 , originando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) ou NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) são utilizados como doadores de elétrons em uma reação catalizada pela NADPH oxidase. $O_2^{\cdot-}$ é subseqüentemente convertido para H_2O_2 (Pick; Keisari, 1980; Pick; Mizel, 1981).

O NO é uma molécula que possui uma grande variedade de funções e atua em muitos processos fisiológicos, entre eles na regulação do sistema imune (Halliwell; Gutteridge, 1984; Kiechle; Malinski, 1993). Além disso, essa molécula também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrada sua ação antibacteriana, antiviral e antiparasitária (Flora Filho; Zilberstein, 2000).

Redes complexas de citocinas interagem de um modo dinâmico para regular as respostas imunes e outras funções biológicas (Ollier, 2004). Dentre as citocinas, encontra-se o TNF- α , que foi purificada, seqüenciada e teve seu gene clonado em meados dos anos 80. Desde então, várias propriedades atribuídas a essa citocina têm sido demonstradas (Eigler et al., 1997). É uma citocina multifuncional que possui funções centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (Palladino et al., 2003). O TNF- α age no crescimento de fibroblastos (Vilcek et al., 1986; Beutler; Cerami, 1989) e apresenta atividade citotóxica induzindo reativos intermediários do oxigênio, não somente em macrófagos e polimorfonucleares, mas também em células cancerígenas (Zimmerman et al., 1989). É quimiotático para neutrófilos (Shalaby et al., 1985; Postelthwaite; Seyer, 1990) e ajuda na proliferação e diferenciação de células B humanas

(Jelinek; Lipsky, 1987), interferindo no processo de citodiferenciação e de proliferação celular. Também age sinergisticamente com a interleucina-1 (IL-1) na ativação osteoclástica, associado à liberação da prostaglandina- E_2 (Vassalli, 1992).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Entre essas substâncias estão os flavonóides, polifenóis encontrados em plantas e presentes em grande quantidade na dieta humana. Esses compostos possuem várias atividades biológicas, incluindo propriedades imunomodulatórias e atividades antioxidantes (Ielpo et al., 2000).

O objetivo do presente estudo foi determinar a liberação do H_2O_2 , NO e TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais na presença dos extratos metanólicos e etanólicos obtidos das folhas de *Davilla elliptica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *Davilla elliptica* foram coletadas no Porto Nacional, Estado do Tocantins, Brasil e identificadas por Eduardo Ribeiro dos Santos. Uma exsicata (4583) foi depositada no Herbário da Universidade do Tocantins.

Preparação dos extratos metanólico e etanólico

Os extratos metanólico e etanólico foram preparados, separadamente a partir de 1000 g das folhas de *Davilla elliptica*, secas ao ar livre e moídas. Sobre o material vegetal foi vertido, 4L de metanol ou etanol em um galão de vidro de 5L, em seguida, os galões foram hermeticamente fechados e deixados sob maceração por uma semana. As misturas foram filtradas em papel-filtro. Após a primeira extração, os procedimentos foram repetidos. As concentrações dos extratos foram feitas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, fornecendo 142,4g do extrato metanólico (rendimento de 14,24%) e 186,9g do extrato etanólico (rendimento de 18,7%).

Triagem fitoquímica

As análises cromatográficas foram feitas em placas de sílica gel (Macherey Nagel) eluídas em diferentes sistemas de solventes tolueno/acetato de etila 8:2 (v:v) e clorofórmio/metanol/*n*-propanol/água, 5:6:1:4 (v:v:v:v) e clorofórmio/metanol 85:15 (v:v)

Os flavonóides foram identificados por sua coloração intensa em luz UV (254 nm) quando revelados com NP/PEG no sistema de solventes clorofórmio/metanol (85:15, v:v) (Wagner et al., 1984). Foram utilizados também padrões autênticos (Sigma) dos flavonóides existentes em nosso laboratório (quercetina, kaempferol e miricetina).

Tabela 1. Triagem fitoquímica dos extratos metanólico e etanólico das folhas de *D. elliptica*. O símbolo (X) indica a presença e o (-) a ausência de determinada substância.

Classes de compostos analisados	Extrato metanólico	Extrato etanólico
	Presença/Ausência	Presença/Ausência
Flavonóides	X	X
Triterpenos	X	X
Esteróides	X	X
Ácido gálico	X	X
Catequinas	X	X
Saponinas	-	-
Alcalóides	-	-
Antraquinonas	-	-
Cumarinas	-	-

Os testes para taninos foram realizados segundo os procedimentos descritos por Simões et al. (2001) na reação com a gelatina e Schneider (1990) na reação com sais de ferro.

Utilizou-se também, vapores de iodo e soluções de CeSO_4 (saponinas e terpenóides), Iodoplatinato (alcalóides), vapores de amônia (antraquinonas e cumarinas) e anisaldeído/ácido sulfúrico (flavonóides, saponinas, terpenos, esteróides, ácidos gálico e catequinas) (Wagner et al., 1984).

Preparação dos extratos para o ensaio imunológicos

As folhas da planta, secas e em pó (1.0 kg) foram extraídas com metanol ou etanol em temperatura ambiente por uma semana. Os solventes foram evaporados a 60°C sob pressão reduzida. Após, os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida diluídos em meio de cultura (RPMI-1640). Nenhuma das amostras continha mais que 1% de DMSO. Todos os extratos foram testados na mesma concentração (250 µg/mL).

Animais

Camundongos Swiss (6-8 semanas, pesando entre 18 a 25 g), fornecidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil, foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum*, em local climatizado (23 ± 1°C, 55 ± 5%, 10-18 circulação/h) com controle de claro e escuro a cada período de 12-h.

Células do exsudato peritoneal

Os camundongos foram inoculados com 3mL de tioglicolato de sódio 3% três dias antes do experimento. As células do exsudato peritoneal (PEC) foram coletadas dos animais usando 5mL de PBS estéril, pH 7.4. As células foram lavadas duas vezes e centrifugadas 200 g por 5 min a 4°C e ressuspensas em meio apropriado para cada teste.

Determinação de H_2O_2

PEC (2×10^6 células/mL) foram obtidas como descrito anteriormente e ressuspensas em uma solução contendo 140 mmol NaCl, 10 mmol de tampão fosfato de potássio (pH 7.0), 5.5 mmol dextrose, 0.56 mmol vermelho de fenol, e 0.01 mg/mL peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma). Em seguida, 100µL dessa suspensão foi transferida para microplacas de 96 cavidades e exposta a 50µL dos extratos. Solução de Zimosan em tampão fosfato foi usado como controle positivo. As células foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C com 7,5% CO_2 (Forma Scientific). A reação foi interrompida com 50µL de NaOH 4N e, a seguir, foram feitas leituras em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Labsystems) a 620 nm contra um branco contendo solução vermelho de fenol e 4 N NaOH. Os resultados foram expressos em nanomoles de $\text{H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ células peritoneais, a partir de curva-padrão previamente estabelecida para cada teste, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho de fenol (Pick; Keisari, 1980; Pick; Mizel, 1981).

Determinação de óxido nítrico (NO)

PEC (5×10^6 células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI-1640 completo (Sigma) contendo 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomina, 5×10^{-2} M mercaptoetanol e 5% de soro fetal bovino (Gibco, USA). 100iL dessa suspensão foi distribuída em placas de 96 cavidades estéreis e incubada com 100 mL dos diferentes extratos por 24 h a 37°C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO_2 . Lipopolissacarídeo (LPS- *Escherichia coli* O111:B4) foi usado como controle positivo. Após incubação, alíquotas de 50 mL do sobrenadante de cada amostra foram adicionadas a 50 mL do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% naftiletilediamina e 3% H_3PO_4) e incubados por 10 min em temperatura ambiente. A reação foi lida a 540 nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Labsystems). O resultado foi expresso em µmols de NO por 5×10^5 células através de curva-padrão obtida anteriormente com concentrações

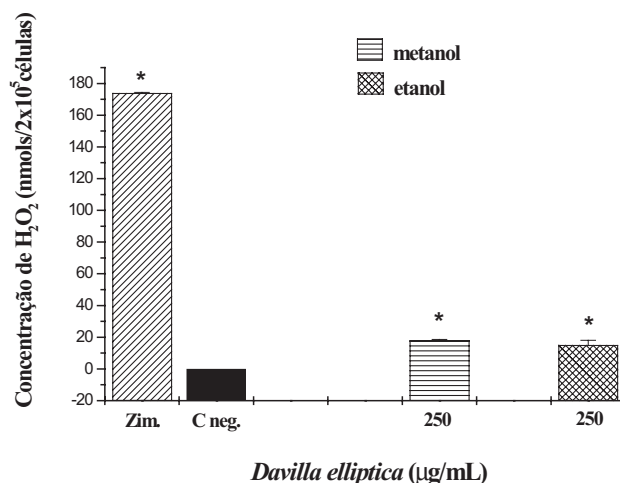


Figura 1. Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss estimuladas com os extratos metanólico e etanólico de *Davilla elliptica*. Zimosan (Zim) é o controle positivo. Apenas células em tampão fosfato foram utilizadas como controle negativo (Cneg). Cada barra representa a média \pm desvio-padrão de cinco experimentos.

* $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo

molares conhecidas de NaNO₂ (Green et al., 1982).

Determinação da produção de TNF- α

Para a produção de TNF- α , PEC aderentes foram estimulados com 34 μ l dos extratos da planta. LPS foi usado como controle positivo. Após 24 h, os sobrenadantes foram removidos, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich Zentrifugen) a 7800 \times g, colocados em eppendorfs e estocados a -80 °C até a realização do bioensaio. Células tumorais de camundongos da linhagem L929 foram utilizadas para medir os níveis de TNF- α nos sobrenadantes das culturas (Carswell et al., 1975). Células L929 em meio RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino (Sigma) foram colocadas em microplacas (Corning) (4 \times 10⁴ células/por orifício) e incubadas overnight a 37°C em estufa com 7,5% de CO₂ (Forma Scientific). Os sobrenadantes da cultura (100 μ l), em triplicata, foram incubados com 1.0 μ g de actinomicina D mL⁻¹ (Sigma) (100 μ l). No dia seguinte, a viabilidade das células L929 foi avaliada fixando-as com violeta cristal (0.2 % em 20 % metanol) e dissolvendo as células coradas com 0,1mL de lauril sulfato de sódio 1 % por orifício. A absorbância foi lida a 490nm leituras em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Labsystems). As unidades de TNF- α foram calculadas usando curva padrão obtida anteriormente com TNF- α recombinante. Para confirmar a presença de TNF- α nos sobrenadantes das culturas, essas preparações foram previamente incubadas com soro imune de coelho anti TNF- α (Carlos et al., 1994).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste-t de Student (Microcal Origin 5.0). O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Inicialmente, a triagem fitoquímica dos dois extratos indicou a presença de flavonóides, triterpenos, esteróides, ácido gálico e catequinas (Tabela 1). Flavonóides derivados da quercetina e da miricetina com uma unidade de açúcar estão presentes (manchas com Rf ~ 0,3 e ~02 no sistema de solventes clorofórmio:metanol 85:15, v:v).

Posteriormente, foram realizados os testes imunológicos. Os extratos metanólico e etanólico de *D. elliptica* não produziram quantidades expressivas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Figura 1), contudo ambos mostraram uma moderada liberação de óxido nítrico, aproximadamente 28 μ mol (Figura 2). O extrato etanólico mostrou uma moderada produção de TNF- α (39,5 unidades/mL), mas o extrato metanólico induziu uma liberação maior (143,2 unidades/mL) (Figura 3).

O efeito citotóxico dos extratos foi avaliado pela determinação do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT) como descrito anteriormente por Mossman (1983). O índice de citotoxicidade 50 (IC₅₀) encontrado foi superior a 300 μ g/mL (dados não mostrados).

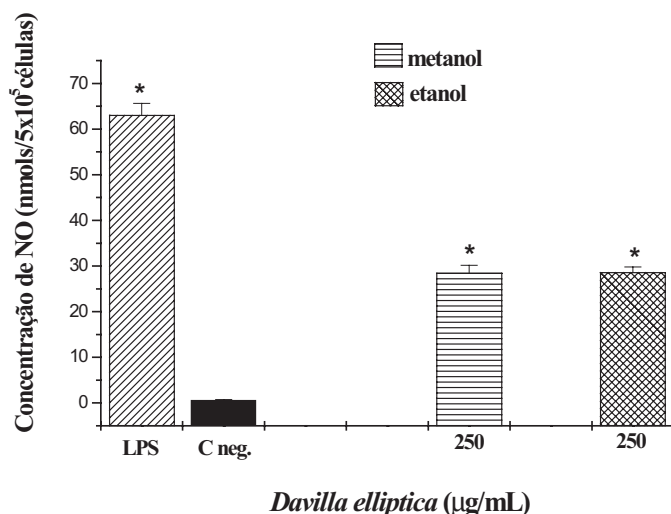


Figura 2. Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss estimuladas com os extratos metanólico e etanólico de *Davilla elliptica*. LPS é o controle positivo. Apenas células no meio (RPMI-1640) foram usadas como controle negativo (Cneg). Cada barra representa a média \pm desvio-padrão de cinco experimentos.

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

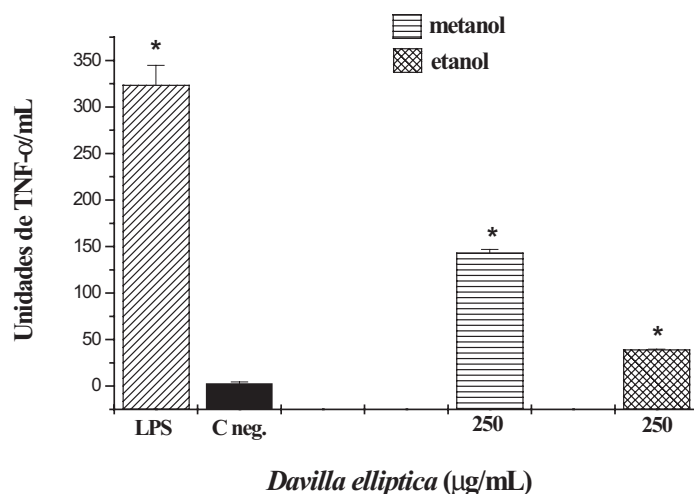


Figura 3. A produção de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss estimuladas com os extratos metanólico e etanólico de *Davilla elliptica*. LPS é o controle positivo. Apenas células no meio (RPMI-1640) foram usadas como controle negativo (Cneg). Cada barra representa a média \pm desvio-padrão de cinco experimentos.

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

DISCUSSÃO

Nosso grupo investiga plantas brasileiras usadas na medicina popular. Foram realizados estudos imunológicos e fitoquímicos dos extratos metanólico e etanólico de *Davilla elliptica*.

O gênero *Davilla* possui a seguinte composição fitoquímica: açúcares, taninos e flavonóides como quercetina, miricetina, quercetina-3-*O*- α -L-ramnosídeo e miricetina-3-*O*- α -L-ramnosídeo (David et al., 1996). Baseado na triagem fitoquímica realizada com os extratos etanólico e metanólico das folhas de *D. elliptica*,

observou-se que flavonóides derivados da quercetina e da miricetina com uma unidade de açúcar estão presentes, além de outras classes de compostos existentes, conforme Tabela 1.

Os ensaios imunológicos mostraram que a produção de H₂O₂ não foi muito expressiva nos dois extratos, embora uma pequena quantidade seja um resultado importante. Sob condições fisiológicas normais, o H₂O₂ é gerado em pequenas quantidades e é rapidamente utilizado ou degradado, mas longas exposições a altas concentrações deste mediador podem destruir estruturas biológicas e levar a um dano celular irreversível. O H₂O₂ é tóxico para as células e é também responsável pela morte das bactérias fagocitadas (Ramasarma, 1990).

Neste trabalho, os resultados mostraram que os extratos metanólico e etanólico estimularam a produção de NO e TNF- α por macrófagos murinos. O NO está envolvido na morte ou inibição da proliferação de microrganismos, destruição de células tumorais por macrófagos ativados e na defesa inespecífica do hospedeiro (Stuehr; Nathan, 1989; Hibbs et al., 1987). Além disso, estudos recentes demonstraram que macrófagos murinos estimulados com TNF- α produziram NO via expressão da indução do gene da óxido nítrico sintase, e acredita-se que reativos intermediários do nitrogênio assim produzidos desempenhem um papel significativo nas atividades tumoricida e microbicida (Xie et al., 1992; Lorschach et al, 1993).

Ambos os extratos induziram a produção de TNF- α , embora o extrato metanólico liberou uma maior quantidade desse mediador comparado com o extrato etanólico. O exato mecanismo pelo qual o extrato metanólico da *D. elliptica* induziu quase cinco vezes mais TNF- α que o extrato etanólico e a identificação de outros componentes importantes nesse extrato ainda precisam ser elucidados.

O extrato da planta *Echinacea purpurea* tem sido largamente utilizado como um estimulante do sistema imune e estudos *in vitro* mostraram que essa planta pode aumentar a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α pelos macrófagos (Burger et al., 1997).

Platycodon grandiflorum, planta da medicina tradicional oriental, estimula a proliferação de macrófagos, a fagocitose, a atividade citostática e produção de óxido nítrico de maneira dose-dependente. A produção de citocinas tais como TNF- α , IL-1b e IL-6 foram aumentadas, sugerindo que *P. grandiflorum* é um potente estimulante da função dos macrófagos (Chul et al., 2001).

Silimarina é uma mistura de flavonóides bioativos isolados da *Silybum marianum*. Testes utilizando camundongos tratados com silimarina mostram que ocorre uma supressão da função dos linfócitos T quando baixas doses são utilizadas, contudo uma estimulação do processo inflamatório ocorre com o uso de altas doses (Johnson et al., 2003).

Estes dados são promissores, porém métodos

preparativos rápidos são necessários para o fornecimento de quantidades suficientes de compostos com o intuito de realizar testes farmacológicos *in vivo* com compostos isolados ou frações enriquecidas. Além disso, é possível que os resultados encontrados nesse estudo sejam devidos a ação dos flavonóides derivados da quercetina e da miricetina, contudo testes futuros utilizando os flavonóides isolados da planta são necessários.

No presente trabalho, a análise dos resultados sugere que ambos extratos da *D. elliptica* podem modular a ativação dos macrófagos. O efeito imunoestimulatório observado pode ser benéfico no aumento da imunidade em doenças infecciosas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do Programa Biota-Fapesp e a Marisa Campos Polesi Placeres, técnica do Laboratório de Imunologia Clínica.

REFERÊNCIAS

- Agarwal SS, Singh VK 1999. Immunomodulators: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides: Part I. Medicinal plants. *Proc Indian Natl Sci Acad B* 65: 179-204.
- Beutler B, Cerami A 1989. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-655.
- Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG 1997. Echinacea induced cytokine production by human macrophages. *Int J Immunopharmacol* 19: 371-379.
- Carlos IZ, Sgarbi DBG, Angluster J, Alviano CS, Silva CL 1994. Disturbances in the production of interleukin-1-necrosis and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia* 127: 189-194.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666-3670.
- Chul YC, Ji YK, Young SK, Young CC, Kyung-Soo H, Hye GJ 2001. Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Cancer Lett* 166: 17-25.
- David JM, Cruz FG, Guedes MLS, Chavez JP 1996. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. *J Braz Chem Soc* 7: 115-118.
- Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S 1997. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 18: 487-492.
- Flora Filho R, Zilberstein B 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev Ass Med Brasil* 46: 265-271.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:

- 131-138.
- Halliwell B, Gutteridge JMC 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
- Hamburger M, Hostettmann K 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30: 3864-3874.
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476.
- Ielpo MT, Basile A, Miranda R, Moscatiello V, Nappo C, Sorbo S, Laghi E, Ricciardi MM, Ricciardi L, Vuotto ML 2000. Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia* 71: S101-109.
- Jelinek DF, Lipsky PE 1987. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Immunol* 139: 2970-2976.
- Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP 2003. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med* 69: 44-49.
- Johnston RB 1988. Current concepts in immunology: monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 318: 747-752.
- Kiechle FL, Malinski T 1993. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Clin Chem* 100: 567-573.
- Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW 1993. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *J Biol Chem* 268: 1908-1913.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Ollier WE 2004. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 28: 174-178.
- Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL 2003. Anti TNF- α therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov* 2: 736-746.
- Pick E, Keisari Y 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38: 161-170.
- Pick E, Mizel DJ 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 46: 211-226.
- Postelthwaite AE, Seyer JM 1990. Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor- α (TNF- α) and a synthetic TNF- α 31-68 peptide. *J Exp Med* 172: 1749-1756.
- Puri A, Saxena RP, Saxena KC 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod* 56: 995-999.
- Ramasarma T 1990. H₂O₂ has a role in cellular regulation. *Indian J Biochem Biophys* 27: 269-274.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais. *Ciênc Agrotec* 25: 102-123.
- Rodrigues LA, Carvalho DA, Gomes LJ, Botrel RT 2002. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em luminárias – MG. *Boletim Agropecuário* 52: 1-34.
- Schneider, G. 1990. *Arzneidrogen-ein kompendium für pharmazeuten, biologen und chemiker*. Mannheim: Wissenschaftsverlag.
- Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinder-Knecht E, Svdersky LP, Finkle BS, Palladino MA 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon and tumor necrosis factors. *J Immunol* 135: 2069-2073.
- Simões CMO, Schemkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR 2001. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 3ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS, Ed. da UFSC, 821 p.
- Stuehr DJ, Nathan CF 1989. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555.
- Vassalli P 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10: 411-452.
- Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-Destefano D, Swenson C, Feiman R, Hirai M, Tsujimoto M 1986. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163: 632-643.
- Wagner HM, Bladt S, Zgajki EM 1984. *Plant drug analysis*. Berlin: Springer, 303p.
- Xie O-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225-228.
- Yamada CSB 1998. Fitoterapia: sua história e importância. *Rev Racine* 43: 50-51.
- Zimmerman RJ, Marafino BJ, Chan, A, Landre P, Winkelhake JL 1989. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant tumor necrosis factor *in vivo*. *J Immunol* 142:1405-1409.