

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**ESTUDO DA ATIVIDADE *in vitro* DE EXTRATOS
DE PLANTAS MEDICINAIS FRENTE A
*Trichomonas vaginalis***

LÚCIA MARIA BRAGAZZA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. MARISA PORTA MICHE HIRCHFELD

São Paulo

1997

15323

USP-CQ

MONOGRAFIAS

15323-F



Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

B813e **Bragazza, Lúcia Maria**
Estudo da atividade *in vitro* de extratos de plantas medicinais frente a
Trichomonas vaginalis / Lúcia Maria Bragazza. – São Paulo, 1997.
83p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Hirschfeld, Marisa Porta Miche

1. Protozoologia médica 2. Medicina doméstica 3. Plantas medicinais
I. T. II. Hirschfeld, Marisa Porta Miche, orientador.

616.016 CDD

Lúcia Maria Bragazza

**Estudo da atividade *in vitro* de extratos de plantas medicinais
frente a *Trichomonas vaginalis***

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Profa. Dra. Maira Fresta Niche Hirschfeld

Presidente

Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães

1º Examinador

Profa. Dra. Elviede Marianne Bachi

2º Examinador

São Paulo,

27

de

junho

de 1997.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do curso de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas - SP.

“Oh! imensa é a graça poderosa que reside nas ervas e em suas raras qualidades, porque na terra não existe nada tão vil que não preste à terra algum benefício especial...Dentro do cálice da débil flor residem o veneno e o poder medicinal”

(Cena III, Ato II Romeu e Julieta - William Shakespeare, 1564-1616)

Aos meus pais Gianfelice e Maria Antonietta,

que sempre souberam transmitir com amor, sabedoria e compreensão os valores essenciais da vida e que não pouparam esforços para minha formação profissional, todo meu amor.

Ao Rodolfo José Alonso, in memoriam,

meu pequeno tributo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa Dra *Marisa Porta Miche Hirschfeld* não somente pela orientação nos caminhos do processo dialético, mas também pela confiança e amizade que possibilitaram a elaboração deste trabalho.

Aos caros amigos Professores *Issao Kameyama* e *Marlene de Fátima Sarmiento Nery*, pelos ensinamentos transmitidos, pelas indispensáveis sugestões apresentadas e pelos exemplos de caráter e profissionalismo em que me espelho.

Ao Prof. *José Luís Aiello Ritto* pela identificação botânica de parte das plantas utilizadas neste trabalho, auxílio na confecção de extratos, sugestões e por estimulantes discussões acerca de questões pertinentes à farmacognosia.

Ao Dr. *Pedro Melillo de Magalhães*, pela identificação botânica de parte do material vegetal utilizado neste trabalho e pela solicitude por minha pessoa.

Ao meu irmão *Bruno Domenico Bragazza* pelos valiosos conselhos, pelos ensinamentos na área de informática e pelo auxílio na editoração deste trabalho.

À minha irmã *Claudia Bragazza Beghini* pelo incentivo constante.

Às nonnas *Irene Bragazza* e *Maria Terzariol* pelo apoio, dedicação e sobretudo amor.

A todos que colaboraram silenciosa ou informalmente na elaboração deste trabalho, especialmente minha *família*, *amigos* e *alunos* pelo inesgotável apoio, carinho e compreensão, minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Às amigas professoras do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da PUCCAMP, *Neusa Maria Osti, Maria de Fátima Lino Coelho, Marcia Regina Cossa Wenning, Maria Magali Soares Stellato, Silvia de Oliveira Santos Cazenave e Sheila Yumi Nakamura* que com companheirismo, incentivaram a realização deste trabalho.

À Prof Dra *Elfriede Mariane Bacchi*, pela fundamental ajuda na fase inicial deste trabalho.

Ao CPQBA (UNICAMP) em nome de seus pesquisadores *Rui R. Bosshard, Rodney A. F. Rodrigues, Renato Sarkis*, e em especial ao *Wladimir M. Gordo*, pelo auxílio na elaboração dos extratos de plantas na fase inicial deste trabalho.

Ao Prof. *Nicolai Sharapin*, pelo seu apoio e orientação na fase inicial deste trabalho.

À *equipe de saúde e aos Coordenadores dos Centros de Saúde Jardim Ipaussurama, Integração da Vila Castelo Branco, Jardim Itatinga, Prof. Dr. Pedro A. Aquino Neto, e Laboratório Municipal de Patologia Clínica de Campinas* pela colaboração na coleta de material de secreção vaginal, material essencial para realização deste trabalho.

Ao Prof. *Orlando Mário Soeiro*, pelo incentivo e revisão do texto referente à descrição botânica das espécies vegetais.

À *Sonia Maria Handlovics Tavares*, não somente pela prestimosa colaboração na manutenção das cepas de *T. vaginalis*, mas também pela amizade e apoio que contribuíram na otimização da parte experimental.

Ao *Edson Tavares* que com generosidade mostrou que a esteira do cooperativismo pode se estender a outros ambientes que não o próprio local de trabalho.

Às funcionárias do Laboratório de Parasitologia da PUCAMP, *Marcia Watanabe* e *Maria Celeste Coutinho*, pelo auxílio na esterilização de materiais e também pela dedicação e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da PUCAMP, *Regina A. de Melo*, *Ellen B. Simões*, *Suzete Costa*, *Dulcinéia R. Willians*, *Maria Franquilina* e *Márcio L. Zaniboni* pela amizade e especialmente *Marcos Marasca*, pelo auxílio no transporte das secreções vaginais.

Às funcionárias do Laboratório de Farmacognosia da PUCAMP, em especial a *Lilian Fernanda Mantovani* pela assistência prestada na elaboração dos extratos.

Ào Sr. *Honório Vieira da Silva*, pelo auxílio durante a coleta do material botânico.

À bibliotecária *Moema R. dos Santos* da Biblioteca Central do Instituto de Química da USP, que com paciência, bom humor e rigor científico, fez as correções oportunas das referências bibliográficas.

Ao amigo *José Augusto Diniz Pinto* pela amizade, incondicional apoio e auxílio na revisão literária do texto.

À PUCAMP, pela infraestrutura concedida e pelo subsídio financeiro para viabilização deste estudo.

À DEUS por estes novos rumos!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Secreções vaginais.....	15
3.1.1. Pesquisa de <i>T. vaginalis</i>	16
3.2. Isolamento e manutenção das cepas de <i>T. vaginalis</i>	16
3.3. Meio de cultura de <i>T. vaginalis</i>	16
3.4. Material botânico.....	18
3.4.1. Procedência do material botânico.....	18
3.4.1.1. Localização geográfica da região de Campinas.....	19
3.4.2. Generalidades das Espécies Vegetais.....	19
3.4.3. Coleta, identificação e acondicionamento do Material Botânico.....	29
3.5. Obtenção dos extratos vegetais.....	30
3.5.1. Técnica da determinação da perda por dessecação.....	31
3.6. Teste de Sensibilidade <i>in vitro</i> pela técnica de diluição em caldo.....	32
3.6.1. Cepas.....	32
3.6.2. Padronização do inóculo.....	32
3.6.3. Preparação dos meios de cultura com os extratos metanólicos obtidos das plantas.....	33
3.6.4. Técnica de diluição em caldo.....	33
3.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	34

3.8. Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM).....	34
3.9. Reprodutibilidade do teste de diluição em caldo	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Isolamento e manutenção das cepas de <i>T. vaginalis</i>	36
4.2. Valores de concentração dos extratos pela técnica de perda por dessecação.....	36
4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos metanólicos de plantas medicinais pela técnica da diluição em caldo	36
4.3.1. Reprodutibilidade da técnica	36
4.3.2. Resultados dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i>	37
4.4. Determinação da concentração letal mínima (CLM) dos extratos metanólicos de plantas medicinais pela técnica da diluição em caldo	38
4.4.1. Reprodutibilidade da técnica	38
4.4.2. Resultados dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i>	38
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	58
7. RESUMO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A tricomoníase causada pelo protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* (Donnè, 1837) (HEGNER & TAGLIAFERRO, 1925) é moléstia cosmopolita, com mais de 150 milhões de casos relatados por ano no mundo (JOHNSON, 1993).

A principal forma de transmissão é através das relações sexuais. Ocorre de preferência no grupo etário de 16 a 35 anos. Entretanto, a propagação em outras circunstâncias pode ocorrer muitas vezes, quando a promiscuidade e a falta de higiene asseguram a transferência do parasita através da água do banho, das instalações sanitárias, de objetos de toalete e de roupas íntimas ou de cama (JIROVEC & PETRU, 1968; REY, 1991). A infecção em neonatos, a partir de mães parasitadas, também pode ocorrer. Entretanto, os relatos desta forma de transmissão são muito raros (DANESH et al., 1995).

A tricomoníase é reconhecida como uma das principais doenças sexualmente transmissíveis (DST), (HONIGBERG, 1978; KENGNE et al., 1994) e seu espectro clínico varia desde completa ausência de sintomas até manifestações inflamatórias severas (HONIGBERG, 1978).

Dentre as manifestações clínicas que mulheres parasitadas com *T. vaginalis* podem apresentar, a leucorréia é a mais freqüente. Consiste de um corrimento abundante, geralmente esbranquiçado, cremoso, espesso e sem sangue. Normalmente, a leucorréia é acompanhada de prurido genital ou perigenital. Segundo vários autores, *T. vaginalis* é o agente etiológico mais freqüentemente encontrado nos casos de vaginites e uretrites em mulheres

(HONIGBERG, 1978; KRIEGER et al., 1990; REY, 1991; SARDANA et al., 1994; SINGH, 1994). Entretanto, casos assintomáticos também podem ocorrer em indivíduos do sexo feminino, na frequência de 25 a 50%, segundo COTCH et al. (1991).

Em gestantes, a presença de *T. vaginalis* pode levar a parto prematuro, em decorrência da ruptura de membranas, segundo MINKOFF et al. (1984), HARDY et al. (1984) e GIBBS et al. (1992).

Apesar da elevada morbidade humana, especialmente entre as mulheres, *T. vaginalis* tem sido pouco estudado em relação à virulência e patogenicidade. O pré-requisito para o estabelecimento da infecção por *T. vaginalis* nas mulheres é a adesão do parasita às células epiteliais vaginais, uma vez que os mesmos precisam vencer a constante secreção que ocorre na vagina. De fato, o corrimento abundante produzido na tricomoníase pode dificultar a ancoragem do parasita no epitélio vaginal. Entretanto, *T. vaginalis* é capaz de vencer esta e outras barreiras, como a influência hormonal durante a progressão do ciclo menstrual, através da produção do fator de adesão celular. A citoaderência envolve a interação entre as moléculas de superfície do parasita (adesinas) com moléculas específicas presentes na superfície da membrana da célula hospedeira (GARBER & LEMCHUCK-FAVEL, 1990; ALDERETE et al., 1995). GARBER & LEMCHUCK-FAVEL (1990) demonstraram a correlação entre a severidade clínica de vaginite causada por *T. vaginalis* e o aumento da produção *in vitro* do fator de adesão celular, sugerindo ser este fator um importante marcador da virulência das cepas de *T. vaginalis*.

No homem a infecção normalmente é assintomática, subclínica e benigna. Quando sintomática, pode produzir uretrites, próstato-vesiculites ou

outras síndromes genito-urinárias indeterminadas (REY,1991 ; KRIEGER et al.,1992; KRIEGER et al, 1993a; KRIEGER et al.,1993b; WEINBERGER & HARGER, 1993 ; PILLAY et al. , 1994).

O diagnóstico laboratorial da tricomoníase é classicamente realizado pela demonstração do parasita através de sua morfologia e movimentação características, observada à microscopia óptica de luz. Para a pesquisa utiliza-se o exame direto a fresco de secreção vaginal, uretral, prostática ou do sedimento urinário (PESSOA, 1978; REY, 1991). Apesar da elevada especificidade do exame direto a fresco, o teste apresenta sensibilidade variável entre 50 a 80%, não sendo recomendado quando os parasitas estiverem presentes em pequena quantidade na amostra a ser analisada (SHARMA et al., 1991; DRAPER et al., 1993). Portanto, nos casos onde houver a suspeita clínica de tricomoníase e o exame a fresco apresentar-se negativo para *T. vaginalis*, recomenda-se o cultivo destes espécimes em meios de cultura apropriados. Na revisão da literatura constatamos que existem vários meios de cultivo recomendados para o isolamento e manutenção de *T. vaginalis* . Os meios de cultura mais utilizados atualmente são o meio de Kupferberg e o meio de Diamond original ou modificado segundo vários autores (MICHE, 1978; FOUTS & KRAUS, 1980; THOMASON et al., 1988; SCHMID et al.,1989; REY,1991; PILLAY et al.,1994).

O meio de Kupferberg (STS = soro tripticase simplificado) desenvolvido em 1948 e o meio de Diamond (TYM = tripticase, extrato de levedura e maltose) descrito em 1957, derivam do meio formulado por Jonhson e Trussel (1943) originalmente conhecido por CPLM (cisteína, peptona de fígado e maltose). Os principais componentes do meio de Kupferberg são: cisteína,

triptona, soro bovino e maltose. O meio de Diamond original tem como constituintes: tripticase digerida, extrato de levedura, cisteína, maltose, ácido ascórbico e soro de ovelha. O cultivo axênico de *T. vaginalis* é possível quando adiciona-se antibióticos a estes meios. *T. vaginalis* por ser um parasita anaeróbio, aerotolerante, exige presença de alguns componentes no meio de cultura, essenciais para seu crescimento e multiplicação, tais como: cloridrato de cisteína, ágar, soro, glicose ou maltose (DIAMOND, 1957; TAYLOR & BAKER, 1968; JIROVEC & PETRU, 1968; HONIGBERG, 1978).

GELBART et al. (1990) usando seis cepas de *T. vaginalis* recém isoladas de pacientes com tricomoníase, compararam o crescimento deste parasita nos meios de Kupferberg e de Diamond modificado por Kraus. Observaram que o período de crescimento exponencial foi maior no meio de Diamond. Constataram também, que no meio de Kupferberg houve um período de 04 horas na fase estacionária, durante o qual, a população de parasitas diminuiu significativamente antes do crescimento exponencial, em relação ao meio de Diamond. Estes autores concluíram ser o meio de Diamond modificado mais adequado para o diagnóstico laboratorial de tricomoníase.

As estatísticas mundiais e as do Brasil revelam taxas de prevalência de tricomoníase que variam de 20 a 40% entre as mulheres sexualmente ativas e cerca de 80% entre aquelas que apresentam leucorréia (REY, 1991). Em homens que apresentam uretrites não gonocócicas, a prevalência de *T. vaginalis* tem sido relatada entre 5 a 20%. Entretanto, a real prevalência deste parasita em homens pode apresentar-se subestimada, uma vez que a maioria das infecções é assintomática (PILLAY et al., 1994).

Tendo em vista que o número de casos de doenças sexualmente transmissíveis tem aumentado na última década, que a complicação destas infecções revertem custos de bilhões de dólares ao ano e sobretudo pelo fato de serem muitas destas doenças consideradas fatores de risco na transmissão do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), muitos esforços têm sido empreendidos por equipes multiprofissionais de saúde, para identificar meios de prevenir a expansão destas doenças (ROSENBERG et al., 1992).

Neste sentido, o interesse no diagnóstico e tratamento da tricomoníase vem se acentuando, principalmente após alguns estudos terem apontado *T. vaginalis* como co-fator na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Provavelmente, por aumentar a susceptibilidade à infecção pelo vírus HIV (LAGA et al., 1993).

O tratamento da tricomoníase é realizado normalmente com drogas derivadas dos nitroimidazólicos. Dentre estas, considera-se o metronidazol como droga de eleição, sendo usada desde 1950 (JONHSON, 1993).

Na revisão da literatura constatamos vários casos de insucesso no tratamento da tricomoníase com metronidazol bem como com outros derivados imidazólicos (tinidazol e nimorazol), em decorrência da resistência desenvolvida por algumas cepas de *T. vaginalis* (MEINGASSNER & THURNER, 1979; FORSGREN & FORSMANN, 1979 ; KULDA et al., 1982 ; LOSSICK et al., 1986). Aliado a este fato, o uso do metronidazol é contra-indicado em gestantes principalmente durante o primeiro trimestre gestacional, em função do potencial efeito mutagênico no DNA fetal ocasionado pelo metronidazol (LOSSICK, 1990).

A maioria das drogas antiparasitárias em uso, tentam adotar formas de ação que interfiram nas vias metabólicas do parasita sem atuar nos caminhos bioquímicos do hospedeiro. Um problema potencial no uso dos caminhos bioquímicos do parasita como sítio de atuação da droga, é que muitos parasitas têm a habilidade de usar outras vias bioquímicas alternativas, conferindo a resistência e ineficácia da droga (MAKIOKA & ELLIS, 1994).

Nesta ótica de atuação, o metronidazol exerce sua ação utilizando os caminhos bioquímicos de baixo potencial de oxidorredução, presente em *T. vaginalis*. O mecanismo de ação envolve a redução de seu grupamento nitro, para formar intermediários citotóxicos de curta duração capazes de reagir com o DNA do *T. vaginalis*. Assim, interrompem a síntese dos ácidos nucleicos, levando à morte o parasita. O oxigênio inibe a captura de metronidazol pelo parasita que é a base de resistência ao medicamento (LOSSIK, 1990; JOHNSON, 1993).

A resistência ao metronidazol também pode ser correlacionada à diminuição na transcrição do gene da ferredoxina (proteína presente no hidrogenossoma de *T. vaginalis*), responsável pela ativação do metronidazol através da redução de seu grupamento nitro. A diminuição da ferredoxina dificultaria a ativação da droga (QHON et al., 1992; JONHSON et al., 1993; TOWNSON et al, 1994).

Considerando-se a crescente importância clínica atribuída às doenças sexualmente transmissíveis, principalmente com o advento da AIDS, numerosas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, na tentativa de se obter novas drogas , naturais ou sintéticas, para o tratamento destas enfermidades.

Historicamente, a cultura popular sempre procurou nos vegetais o tratamento de várias doenças. As origens do conhecimento das virtudes terapêuticas das espécies vegetais foram decorrentes da observação constante e sistemática dos fenômenos e características da natureza e da conseqüente experimentação empírica desses recursos (DI STASI, 1995).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 20.000 espécies de plantas são usadas com fins medicinais em todo o mundo, merecendo destaque a China que dos 5.767 medicamentos utilizados, 4.733 são fitoterápicos (SHARAPIN, 1993; PHILLIPSON, 1994).

Apesar da flora mundial estar estimada em 250. 000 espécies, apenas 6 a 7% destas espécies foram investigadas etnofarmacologicamente (SAMUELSON, 1989; SANTOS et al., 1996). O Brasil contribui com cerca de 120.000 espécies de plantas. A grande maioria presente na região Amazônica, das quais a sabedoria popular selecionou cerca de 2.000 espécies como medicinais. Destas, somente 10% foram investigadas cientificamente do ponto de vista químico-farmacológico (BRITO,1989; BRITO & BRITO, 1993).

No Brasil e em outros países em desenvolvimento, a grande maioria da população não tem acesso à assistência farmacêutica e a utilização de plantas como terapêutica alternativa é amplamente difundida (PHILLIPSON & WRIGHT, 1991a ; FARNSWORTH,1993).

Em trabalho realizado no Brasil pela Coordenadoria de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Serviços da Saúde, foi comprovado que quase 90% da população rural e das periferias urbanas utilizam a medicina caseira antes de procurar a assistência médica (CRUZ, 1988). Assim, contra infecções causadas por parasitas utilizam: bulbos de alho (*Allium sativum*),

partes aéreas e sementes de melão de São Caetano (*Momordica charantia*), sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*); folhas de hortelã (*Mentha sp*), de erva-de-Santa-Maria (*Chenopodium ambrosioides*), de losna (*Artemisia absinthium*); cascas de quina (*Cinchona sp*); e raízes de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*). (COIMBRA, 1958; CORRÊA, 1984; CRUZ, 1988).

A validação do uso terapêutico de várias plantas foi possível através de vários estudos de botânica e etnofarmacologia. Com os avanços tecnológicos do século XIX, principalmente na área Química de Produtos Naturais, os processos de extração de princípios ativos ganharam importância, bem como os processos de síntese e semi-síntese dos mesmos (CARLSON et al., 1946; FARNSWORTH, 1966; TYLER, 1987; FARNSWORTH et al., 1989).

As diversas classes de compostos químicos como alcalóides, terpenos, flavonóides, lignanas, cumarinas, benzenóides, xantonas e lactonas; existentes em determinadas espécies de vegetais superiores, são normalmente sintetizadas através de vias metabólicas secundárias existentes nas plantas (MITSCHER et al., 1987; PIRES & GRIPP, 1988; DI STASI, 1995). As funções destes compostos secundários, até pouco tempo desconhecidas, foram elucidadas com os estudos da ecologia bioquímica (LIMA, 1996). Foi demonstrado que muitas destas substâncias são produzidas como mecanismo de defesa das plantas à diferentes predadores (WILLIAMS et al., 1989; DI STASI, 1995).

Vários destes metabólitos secundários isolados de plantas utilizadas pela medicina popular para o tratamento de diversas parasitoses, constituem-se atualmente, nas principais classes de drogas empregadas contra alguns protozoários. Assim, os antimaláricos : quinina (alcalóide isolado de

cascas de várias espécies sul-americanas de *Cinchona*) e artemisinina (lactona sesquiterpênica, isolada das folhas de *Artemisia annua*, planta medicinal chinesa) e o amebicida emetina (alcalóide obtido das raízes de *Cephalis ipecacuanha*) fazem parte de formas farmacêuticas usadas no mundo todo. (PEI - GEN & SHAN-LIN, 1986; PHILLIPSON & O'NEILL, 1989; WRIGHT & PHILLIPSON, 1990; PHILLIPSON & WRIGHT, 1991a; PHILLIPSON & WRIGHT, 1991b; CUNHA, 1995).

O conhecimento da estrutura química destes metabólitos secundários, possibilitou o desenvolvimento de vários medicamentos sintéticos com ação protozoocida, tais como: as 8 - aminoquinoleínas e as 4 - aminoquinoleínas, derivadas da quinina; o artenusato de sódio, derivado da artemisinina e a dehidroemetina, derivada da emetina. Isto vem enfatizar que a importância da medicina dos produtos naturais não reside somente nos efeitos farmacológicos ou quimioterápicos por eles apresentados; mas também, no papel destas moléculas como moldes para produção de novas drogas (PHILLIPSON & WRIGHT, 1991a; PHILLIPSON & WRIGHT, 1991c ; PHILLIPSON, 1994).

Os produtos naturais oriundos dos vegetais superiores que mostram-se ativos contra infecções causadas por protozoários, podem ser enquadrados em três grandes grupos: alcalóides, terpenóides e quinonas fenólicas. Embora muitos compostos tenham demonstrado atividade protozoocida em experimentos realizados *in vitro* ou em modelos experimentais *in vivo*, um limitado número tem sido empregado clinicamente (PEI-GEN & SHAN-LIN, 1986; PHILLIPSON & O'NEIL, 1989; WRIGHT & PHILLIPSON, 1990).

Na revisão da literatura constatamos que a maioria das pesquisas etnofarmacológicas visando o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas

para o tratamento das protozooses foram realizadas com malária, doença de Chagas, amebíase e leishmaniose. Entretanto, observamos que as publicações referentes a estudos sobre derivados de vegetais superiores em relação a tricomoníase são escassas.

N'DOUNGA et al. (1983) extraíram um composto poliacetilênico denominado fenil 1 heptatrieno 1-3-5 (PHT), das partes aéreas floridas (folhas, flores e espinhos) da planta *Bidens pilosa*. Esta é usada tradicionalmente pela população africana para o tratamento de infecções gastrointestinais e da malária. Os autores testaram a atividade *in vitro* deste composto PHT e do metronidazol, frente a uma cepa de *T. vaginalis* pela técnica da diluição em caldo. Os resultados demonstraram que a concentração inibitória mínima (CIM) do composto PHT foi de 100µg/ml e do metronidazol de 10µg/ml e a concentração letal mínima (CLM) foi de 200µg/ml e de 25µg/ml, respectivamente.

JULIANO et al. (1986) demonstraram a ação *in vitro* do taxol (alcalóide derivado da planta *Taxus brevifolia*) com duas cepas de *T. vaginalis*. Utilizaram a técnica da diluição em caldo com concentrações variando de 1 a 10µM de taxol. Observaram que a concentração inibitória mínima (CIM) ocorreu com 10µM de taxol para as duas cepas de *T. vaginalis* testadas. Os autores citaram hipóteses para explicar a ação do taxol. Entre elas, a possível inativação dos centros de organização dos microtúbulos do parasita pelo taxol.

HAKIZAMUNGU et al. (1988) realizaram estudos *in vitro* de *T. vaginalis* com o diterpenodiol 8 (14), 15- Sandaracopimaradieno- 7 α, 18-diol que é um princípio ativo isolado das folhas da planta *Tetradenia riparia*, anteriormente denominada *Ibosa riparia* (De KIMPE & SCHAMP, 1982). Esta é uma planta

usada tradicionalmente em Rwanda (África Central) como antimalárico, anti-helmíntico e para o tratamento de diarreia, abscessos dentais, febres e dores em geral. A atividade deste diterpenodiol foi determinada pela técnica da diluição em caldo com uma cepa de *T. vaginalis*. As concentrações de diterpenodiol testadas foram 40, 20, 10 e 5 µg/ml. O valor da concentração inibitória mínima (CIM) encontrado foi de 40µg/ml.

KANEDA et al. (1991) testaram *in vitro* pela técnica de diluição em caldo, a atividade do alcalóide berberina (presente em várias espécies de plantas, como *Berberis aristata*, *Berberis laurina*) contra *T. vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Estudaram também, as alterações morfológicas dos parasitas através da microscopia óptica de luz e eletrônica, quando os mesmos eram cultivados em meio contendo o alcalóide em concentrações variando de 0,01 a 1mg/ml. Os resultados demonstraram a inibição do crescimento de *T. vaginalis* na concentração de 1mg/ml, bem como a presença de alterações morfológicas deste protozoário. O parasita *T. vaginalis* apresentou logo após a exposição ao sulfato de berberina, aumento do número de vacúolos autofágicos e a presença de um grande vacúolo; não observados nos cultivos sem o alcalóide.

Em 1992, GASQUET et al. testaram *in vitro* a ação da diplocelina, alcalóide quaternário extraído das raízes e cascas de *Strychnos gossweilera*, contra os protozoários: *T. vaginalis*, *E. histolytica* e *Plasmodium falciparum*. Os resultados revelaram atividade contra uma cepa de *T. vaginalis* na concentração de 25µg/ml e para *E. histolytica* na concentração de 50µg/ml.

HAKIZAMUNGU et al. (1992) testaram a atividade *in vitro* de 30 espécies de plantas frente a uma cepa de *T. vaginalis*. Todas as plantas

estudadas eram usadas na medicina tradicional de Rwanda, sendo 21 delas utilizadas tradicionalmente para o tratamento de doenças causadas por protozoários e 9 escolhidas arbitrariamente entre plantas medicinais empregadas no combate a outras doenças. Estes autores utilizaram como metodologia a técnica da diluição em caldo , testando os extratos metanólicos obtidos das plantas na concentração de 1mg/ml. A atividade tricomonicida dos extratos foi determinada através da contagem dos parasitas após 48 horas de incubação. A planta era considerada ativa contra *T. vaginalis*, somente quando 100% de inibição do crescimento era demonstrada pela ausência de movimentação do parasita. Para confirmação do resultado, era efetuado o subcultivo em tubos contendo somente o meio de cultura e a leitura realizada após 48 horas de incubação. Os autores obtiveram atividade tricomonicida com 17 espécies na concentração testada.

WANG (1993) estudou a ação do princípio ativo emodina, uma antraquinona extraída das raízes e rizomas da planta *Rheum palmatum* L., em ratos submetidos à infecção experimental com *T. vaginalis*, para avaliar a eficácia *in vivo* da emodina. Realizou também, ensaios de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células. Constatou que a administração oral de emodina (500mg/Kg) nos ratos com tricomoníase vaginal, levou à cura da infecção. Nas culturas de células inoculadas com *T. vaginalis*, observou que a emodina diminuiu os efeitos citotóxicos do parasita nas células de mamíferos.

No Brasil, LAUS et al.(1994) avaliaram na cidade de Curitiba - Paraná, a atividade de um gel-creme vaginal de calêndula a 10%, em pacientes com tricomoníase vaginal. Em um grupo de 20 pacientes usaram durante 10 dias o creme de calêndula e em um outro grupo de 20 pacientes utilizaram o

metronidazol por 7 dias (500mg de 12 em 12 h). Os autores constataram 55% de cura clínica e laboratorial no grupo das pacientes tratadas com o creme vaginal de calêndula e 95% de cura no grupo de pacientes tratadas com o metronidazol. Para aumentar a eficácia do gel-creme de calêndula, os autores sugeriram para o tratamento da tricomoníase, a associação do gel com a administração oral de *Mentha crispera*, visto que esta tem ação tricomonocida sistêmica.

Em 1995, WU et al. publicaram o resultado dos estudos realizados *in vitro* dos efeitos do extrato aquoso da planta *Cladonia alpestris* e do ácido S- (-) úsnico sobre *T. vaginalis*. Os resultados mostraram que ambos produziram acentuado efeito tricomonocida *in vitro*, sendo a concentração inibitória mínima (CIM) de 0,4mg/ml.

2. OBJETIVOS

Considerando-se:

- a elevada morbidade da tricomoníase, principalmente em mulheres sexualmente ativas;
- os casos de resistência de *T. vaginalis* à terapêutica disponível;
- a contra-indicação do uso dos nitroimidazólicos durante o período gestacional;
- o risco de parto prematuro em gestantes com tricomoníase;
- a tricomoníase como co-fator na AIDS;
- a participação crescente de medicamentos de origem vegetal no arsenal terapêutico mundial;
- a vasta utilização de plantas medicinais pela cultura popular para o tratamento de parasitoses e da leucorréia;

a escassa literatura sobre o estudo de atividade anti-*T. vaginalis* de extratos brutos de plantas, utilizadas pela população brasileira sob várias formas medicamentosas, este trabalho teve por objetivo:

- avaliar a atividade *in vitro* de extratos brutos de espécies vegetais, utilizadas na medicina popular brasileira, contra cepas de *T. vaginalis* isoladas de pacientes provenientes da cidade de Campinas - SP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SECREÇÕES VAGINAIS

Foram coletadas secreções vaginais de pacientes provenientes da cidade de Campinas - São Paulo, que apresentavam como sinal clínico leucorréia acompanhada ou não de prurido vaginal.

O material foi coletado nos ambulatórios de ginecologia dos Centros de Saúde: Jardim Ipaussurama, Integração da Vila Castelo Branco, Prof. Dr. Pedro Agápio de Aquino Neto, Jardim Itatinga , e nos seguintes laboratórios clínicos: Laboratório Municipal de Patologia Clínica de Campinas e Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCCAMP). A coleta foi realizada pela equipe de saúde, (ginecologistas, enfermeiros, auxiliares de enfermagem) dos centros de saúde e laboratórios.

A coleta de material de fundo de saco vaginal foi realizada após introdução de espéculo vaginal, utilizando-se swab estéril. Em seguida o swab era colocado em tubo estéril contendo cerca de 2,5 ml de solução salina fisiológica estéril (PESSOA, 1978; FOUTS e KRAUS, 1980). As amostras eram então transportadas ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) onde eram processadas para pesquisa de *T. vaginalis*.

3.1.1 Pesquisa de *T. vaginalis*

As suspensões de exsudato vaginal em solução fisiológica, foram centrifugadas a 500g por 2 minutos. Parte do sedimento colhido foi analisado entre lâmina e lamínula em microscopia óptica de luz e o reconhecimento dos *T. vaginalis*, feito pela verificação da morfologia e movimento característico (PESSOA, 1978; REY, 1991).

3.2 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *T. vaginalis*

As amostras de secreção vaginal positivas para *T. vaginalis* no exame a fresco foram semeadas com pipeta estéril, em tubos com batoque de rosca, contendo 5ml no meio de cultura de Diamond modificado com antibióticos e mantidas em estufa à 37°C. Após 72 h de incubação, era realizado exame microscópico direto a fresco da cultura. Quando não se observava presença de *T. vaginalis* vivas, as culturas eram desprezadas. As culturas em que se observava a presença de *T. vaginalis* vivas eram mantidas através de repiques sucessivos em intervalos de 72h e repicadas na proporção de 0,5ml de inóculo para 5,0 ml de meio de cultura (DIAMOND, 1957; MICHE, 1978).

3.3 MEIO DE CULTURA DE *T. vaginalis*

O meio de cultura utilizado para o isolamento e a manutenção dos isolados de *T. vaginalis*, foi aquele descrito por Diamond, com algumas modificações introduzidas por MICHE (1978).

A composição final do meio, por litro foi a seguinte:

1-Tripticase.....	20,0 g
2- Extrato de levedura.....	10,0 g
3- Maltose	5,0 g
4- Cloridrato de cisteína.....	1,0 g
5- Ácido ascórbico	0,1 g
6- Fosfato monobásico de potássio	0,8 g
7- Fosfato dipotássico dibásico	0,8 g
8- Ágar	0,5 g
9- Penicilina.....	1000000 UI
10- Nistatina.....	300 000 UI
11- Sulfato de estreptomicina	1,0g
12- Soro de cavalo estéril	50 ml
13- Água destilada q.s.p.....	1000ml

Para a preparação deste meio de cultura, os componentes foram dissolvidos em água destilada, excetuando - se os antibióticos (penicilina e nistatina e sulfato de estreptomicina) e o soro de cavalo. O ph foi determinado e quando necessário, ajustado com solução de ácido clorídrico 0,1N para valor de pH igual a 6,0. Em seguida, o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave, durante 20 minutos à temperatura de 121°C. O soro de cavalo e os antibióticos foram adicionados esterilmente no balão contendo o meio de cultura, após esfriamento do mesmo à temperatura ambiente. A seguir, o meio de cultura foi distribuído em tubos estéreis, em volumes de 5,0 ml e conservados em geladeira

a temperatura de 4°C. Antes de serem utilizados, permaneciam em estufa a 37°C durante 15 a 20 minutos.

3.4 MATERIAL BOTÂNICO

Foram estudadas as seguintes espécies vegetais: *Artemisia annua*, *Bidens pilosa*, *Calêndula officinalis*, *Mentha rotundifolia*, *Momordica charantia* e *Salvia officinalis*, eleitas pelo critério de seleção etnofarmacológico para o tratamento de parasitoses e/ou da leucorréia.

3.4.1 Procedência do material botânico

As espécies vegetais empregadas para a obtenção dos extratos metanólicos foram provenientes de coleções de plantas medicinais cultivadas no Horto de Plantas Medicinais "Prof. Fernando de Oliveira", pertencente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCCAMP) e na Estação Agrícola Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Ambos localizados na região de Campinas, São Paulo - Brasil.

3.4.1.1 Localização geográfica da região de Campinas

O município de Campinas está localizado na área de contato do Planalto Cristalino Atlântico e da Depressão Periférica do Estado de São Paulo, situado em sua posição centro-leste, ocupando uma superfície de 781 quilômetros quadrados. A cidade de Campinas localiza-se na parte central do município, sendo suas coordenadas: latitudes 22° 52' 20" S e longitude de 47° 04'39" W. O município possui altitude média de 669 m e está situado em áreas de aproximação de clima tropical de altitude, cuja temperatura média anual é de 20.7°C, sofrendo influências das massas de ar Equatorial, Continental, Tropical Atlântica e Polar Atlântica, sendo esta a que exerce maior influência nas mudanças drásticas de temperatura. As condições climáticas e o tipo de solo são similares e representativos de grandes extensões de áreas agricultáveis (PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS, 1988; MAGALHÃES, 1993).

3.4.2 Generalidades das Espécies Vegetais

Na Tabela 1 estão sumariadas as famílias, as espécies vegetais, os nomes populares e as partes dos vegetais utilizadas para a obtenção dos extratos.

TABELA 1 Famílias, espécies vegetais, nomes populares e partes dos vegetais utilizadas para a obtenção dos extratos

Família	Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada
Asteraceae* ¹	<i>Calêndula officinalis</i>	Calêndula	flores
Asteraceae* ²	<i>Artemisia annua</i>	Artemísia chinesa	folhas
Compositae* ¹	<i>Bidens pilosa</i>	Picão preto	espinhos, folhas, ramos e flores
Cucurbitaceae* ¹	<i>Momordica charantia</i>	Melão de São Caetano	ramos e folhas
Labiatae* ¹	<i>Mentha rotundifolia</i>	Hortelã	folhas
Labiatae* ²	<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	folhas

*1 = Procedência (Horto de Plantas Medicinais Prof. Fernando de Oliveira)

*2 = Procedência (Estação Agrícola Experimental CPQBA)

A descrição sumária de cada planta encontra-se a seguir:

FAMÍLIA ASTERACEAE

***Calêndula officinalis* L.**,(Figura 1) conhecida por calêndula, é uma planta anual. Capítulos solitários terminais, em que as flores da periferia são liguladas, femininas, terminam por três dentes e mostram à lupa quatro nervuras longitudinais. As do centro, masculinas, numerosas são tubulosas e quinquelobadas. Flores de coloração amarelo- alaranjada, apresentando na base das corolas, longos pêlos tectores pluricelulares e pluriseriados. Odor fraco,

aromático; sabor amargo (COIMBRA,1958). Originária da Europa a calêndula pode ser cultivada em clima subtropical, desde o final do outono até a primavera (MAGALHÃES ,1993; BERTONI et al., 1996). As partes aéreas da calêndula são empregadas nas dismenorréias, regularizando o ciclo menstrual. Externamente é usada em contusões, queimaduras, impetigo, e em lavagens nas ulcerações vaginais e leucorréia (COIMBRA, 1958, POLUNIN & ROBBINS, 1993).



Figura 1. *Calendula officinalis*

***Artemisia annua* L.** (Figura 2) é uma planta herbácea anual, nativa da Ásia, provavelmente da China, conhecida popularmente por artemísia chinesa. Devido a grande quantidade de sementes que produzem, é considerada invasora, promovendo o alastramento espontâneo da espécie (MAGALHÃES , 1993). É um arbusto alcançando altura variável entre 0,80 cm à 1,50m, habitualmente com haste única e ramos alternados (MAGALHÃES, 1996).



Figura 2. *Artemisia annua*

As folhas variam de 2,5 a 3,0 cm em comprimento, apresentando em ambas as faces, tricômas contendo 10 células biseriadas e 5 células compondo um filamento em forma de T. O capítulo floral de 2 a 3mm de diâmetro é amarelo-esverdeado, cercado por numerosas brácteas imbricadas. Os capítulos estão dispostos em panículas livres, contendo numerosas floretas bissexuais centrais e floretas marginais pistiladas (masculinas), estando os estigmas retorcidos no interior das floretas centrais. Ambas as flores têm corola tubular soldada (simpétala) com o cume dividido em 5 lobos nas floretas hermafroditas e 2 ou 3 lobos nas floretas pistiladas. O receptáculo é glabroso, não tem resíduos e apresenta formato triangular. Ambos, floreta e receptáculo, carregam abundante tricomas pluricelulares biseriados; tricomas filamentosos em forma de T que ocorrem no pedicelo e brácteas (JANICK, 1995). A *A. annua* tem sido usada principalmente como antimalárico, principalmente na malária maligna, causada pelo *Plasmodium falciparum*. A ação antimalárica é atribuída à artemisinina (Ginghaosu) uma lactona sesquiterpênica extraída das folhas de artemísia chinesa, isolada na década de 1970 (PHILLIPSON e WRIGHT, 1991b; WHITE, 1994; MAGALHÃES, 1996).

FAMÍLIA LABIATAE

Salvia officinalis L. (Figura 3) é uma espécie herbácea, anual na região de Campinas, originária das regiões costeiras do mar Adriático e Mediterrâneo, sendo muito cultivada em pequenas hortas e jardins (VON HERTIG, 1986; MAGALHÃES, 1993; AMARAL et al., 1996). É denominada popularmente de sálvia ou salva - das - boticas. É um arbusto lenhoso na base, perene, com caules quadrangulares ramificados, que alcança alturas de 30 a 80

cm, formando touceiras. As folhas inferiores são pecioladas, opostas, finamente reticuladas, levemente recobertas por fina penugem, oblongas, com 3 a 8 cm de comprimento, inteiras ou dentadas, geralmente verde-esbranquiçadas, rugosas, persistentes e espessas. As folhas superiores são sésseis. Conforme a variedade, as flores de até 3 cm de comprimento podem ser azuladas, violetas, rosadas ou brancas. As flores geralmente aparecem entre o começo do verão e o começo do outono (VON HERTIG, 1986). A Sálvia possui odor forte, balsâmico; sabor quente, amargo e aromático (COIMBRA, 1958). As propriedades medicinais da Sálvia são atribuídas principalmente aos óleos essenciais presentes nas folhas, com ações carminativas, espasmolíticas, anti-sépticas e adstringentes (AMARAL et al., 1996). Externamente, sob a forma de decocto é usada no tratamento de estomatite e leucorréia (COIMBRA, 1958).



Figura 3. *Salvia officinalis*

***Mentha rotundifolia* L.** (Figura 4) Huds (sinonímia: *M. spicata* L. var. *rotundifolia* L.) é um híbrido entre as espécies *M. longifolia* L. e *M. suaveolens* Ehrh. (KOKKINI & PAPAGEORGIOU, 1988). É conhecida popularmente como hortelã de cheiro, hortelã comum ou hortelã da folha redonda. Os vários tipos de menta são muito similares e as espécies do gênero *Mentha* apresentam grande polimorfismo, o que leva à produção de numerosas variedades e formas. Além disso, a capacidade de formar híbridos é outra razão para a grande dificuldade na classificação botânica das hortelãs. Todas as espécies cultivadas são híbridas (CORRÊA, 1984). A *M. rotundifolia* é uma planta herbácea de folhas sésseis, quase redondas; rugosas, crenadas ou denteadas, pubescentes. As flores são alvas, dispostas em espigas verticiladas. É originária da Europa, adaptando-se bem ao clima subtropical (CORRÊA Jr. et al., 1994).



Figura 4. *Mentha rotundifolia*

As diversas variedades de hortelã são empregadas popularmente no tratamento de cólicas abdominais e uterinas, nas dismenorréias, no combate às verminoses, amebíase e diarreia de um modo geral (CORRÊA, 1984; RÊGO, 1988; HIRSCHMANN & ARIAS, 1990).

FAMÍLIA CUCURBITACEAE

Momordica charantia L., (Figura 5) conhecida popularmente como melão de São Caetano, é uma planta originária da Ásia e África tropicais, aclimatada no Brasil. É uma planta monóica, herbácea, muito ramificada, com caule estriado; folhas membranáceas suborbiculares, 5 a 7 lobadas, com lobos estreitos na base; gavinhas simples, delicadas e longas, pubescente. Flores masculinas, solitárias em pedúnculo com bráctea reniforme, cálice com lacíneos lanceolado-ovais; estames aglutinados com os lóculos das anteras; flor feminina longo-pedunculada; fruto capsular carnoso, amarelo quando maduro; sementes vermelhas (CORRÊA, 1984; DI STASI et al., 1989). Na medicina popular é largamente utilizada como antitérmico, anti-reumático, anti-helmíntico e antimalárico. Externamente, as folhas são aplicadas contra dores reumáticas, sendo o decocto usado em irrigações vaginais nas leucorréias (COIMBRA, 1958; CORRÊA, 1984; DI STASI et al., 1989; HIRSCHMANN & ARIAS, 1990; GIRON et al., 1991).



Figura 5. *Momordica charantia*

FAMÍLIA COMPOSITAE

***Bidens pilosa* L** (Figura 6) é uma planta daninha pantropical, conhecida popularmente como picão - preto , carrapicho de agulha, erva picão e piolho de padre, ocorrendo no Brasil ao longo do litoral e nas áreas agrícolas do

centro - sul. É uma planta de pequeno porte, até 1 metro de altura, ereta, ramosa, glabra; folhas opostas simples, pecioladas e fendidas; flores amarelas reunidas em inflorescências tipo capítulo: capítulos pleiomórficos com flores radiais liguladas, pentâmeras com cálice modificado formando o papilho que é transformado em aristas (DI STASI et al., 1989; CORRÊA Jr et al., 1994).



Figura 6. *Bidens pilosa*

As partes aéreas da planta são utilizadas principalmente contra icterícia, diabetes e inflamações de modo geral. Também são empregadas popularmente para o tratamento de diarreia, helmintoses, leucorréia, hepatite, amigdalite e escorbuto (N'DOUNGA et al., 1983; CORRÊA, 1984; PEREIRA et al., 1988; DI STASI et al., 1989; LUCCHETTI et al., 1996).

3.4.3 Coleta, identificação e acondicionamento do Material Botânico

A coleta foi realizada no período matutino nos meses de maio e junho de 1996. As amostras representativas das plantas foram colocadas em saco plástico e levadas ao laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da PUCCAMP (DI STASI, 1995).

Após a coleta, parte do material vegetal foi destinado à identificação botânica. Assim, os vegetais *B.pilosa*, *C.officinalis*, *M. charantia* e *M. rotundifolia* foram identificados botanicamente pelo Prof. José Luís Aiello Ritto, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da PUCCAMP e as espécies de *A. annua* e *S. officinalis* identificadas botanicamente pelo Dr. Pedro Melillo de Magalhães, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. As exsiccatas, preparadas com o material florido, encontram-se depositadas no herbário do CPQBA da UNICAMP como testemunha de estudo farmacognóstico sob a designação de: *Artemisia annua* (nº 229), *Bidens pilosa* (nº 349), *Calendula officinalis* (nº 70), *Momordica charantia* (nº 309) e *Salvia officinalis* (nº 127).

O restante do material vegetal foi submetido à secagem, em estufa com circulação forçada de ar a 45° C durante 48 horas. Em seguida,

procedeu-se a pulverização do material seco até a obtenção de pó grosso (FARMACOPÉIA, 1988).

O material pulverizado foi acondicionado em frasco de cor âmbar e mantido sob vácuo.

3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Aproximadamente 30 g do material pulverizado de cada uma das espécies em estudo, foram submetidas à extração com 200ml de metanol em aparelho do tipo Soxhlet, durante 48 horas (PRISTA et al., 1981).

Os extratos metanólicos foram filtrados através de papel comum e evaporados em evaporador rotativo sob vácuo à temperatura de 45°C, até a obtenção de resíduo xaroposo (LIST & SCHMIDT, 1989 ; RITTO*, 1996).

O resíduo obtido de cada extrato foi ressuspensionado em 20 ml de água destilada , sendo em seguida filtrado através de papel, obtendo-se o extrato denominado ea (RITTO*, 1996).

Os extratos ea obtidos das espécies de plantas estudadas, tiveram a concentração calculada em mg/ml, através da técnica de determinação da perda por dessecação, segundo a FARMACOPÉIA , 1988 .

* RITTO, J.L.A. Comunicação pessoal, 1996.

3.5.1 Técnica da determinação da perda por dessecação

Cápsulas de porcelana foram dessecadas em estufa a 105°C, durante 1 hora . A seguir foram acondicionadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Volume de 1,0 ml do extrato ea de cada planta, foi transferido para cada cápsula de porcelana. Em seguida, levou-se à estufa a temperatura de 105°C durante 2 horas. Retiradas da estufa, as cápsulas foram acondicionadas em dessecador para resfriamento à temperatura ambiente, e posterior pesagem. Este procedimento foi repetido, tantas vezes quanto necessário, até a obtenção de peso praticamente constante (FARMACOPÉIA, 1988).

Os resultados foram expressos em mg/ml, representando o valor médio de duas determinações.

Tendo sido calculado os valores de concentração em (mg/ml) de cada extrato ea, estes foram diluídos em água destilada estéril , até obter-se a concentração final de 50mg/ml.

Alíquotas de 1,0ml de cada extrato foram transferidas em condições estéreis e armazenadas em frascos de vidro estéreis, providos de batoque de borracha e mantidos à temperatura de - 15°C.

3.6 TESTE DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* PELA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM CALDO

3.6.1 Cepas

Foram estudadas 20 cepas de *T. vaginalis*, mantidas em meio de cultura de Diamond modificado, no mínimo por 20 repiques sucessivos em intervalos de 72 horas.

3.6.2 Padronização do inóculo

Em tubos de Kahn eram colocados 100µl da suspensão da cultura e 100µl de corante eosina a 0,125% em água destilada. Após homogeneização, transferia-se 1mm³ para o hemocitômetro de Neubauer. A contagem de *T. vaginalis* era realizada nos quatro quadrantes laterais relativos às áreas de contagem de leucócitos. Foram enumerados os exemplares vivos de *T. vaginalis*, sendo calculado o número de parasitas em 1,0 ml de meio de cultura. A viabilidade era demonstrada pela presença de exemplares que não se coravam com a eosina (PIVA, 1988; LIMA, 1991).

Quando necessário, as suspensões eram diluídas em meio de Diamond modificado até serem atingidas as concentrações de 2×10^5 trofozoitas de *T. vaginalis* vivos por 1,0 ml de meio de cultura.

3.6.3 Preparação dos meios de cultura com os extratos metanólicos obtidos das plantas

Os extratos metanólicos das plantas estudadas que apresentavam concentração de 50 mg/ml foram diluídos em meio de cultura de Diamond da seguinte maneira : ao primeiro tubo da série de diluições foram adicionados 3 ml de meio de cultura de Diamond e 1 ml de extrato ea a 50 mg/ml. Nos tubos subseqüentes da série de diluições foi acrescentado somente 2 ml de meio de cultura.

A partir do primeiro tubo foram realizadas diluições seriadas em progressão geométrica na razão 2, transferindo-se após homogeneização, 2 ml do primeiro tubo para o tubo subseqüente. Este procedimento era repetido para os demais tubos, sendo que para o último tubo 2ml eram desprezados.

3.6.4 Técnica de diluição em caldo

Nas séries de diluições dos extratos metanólicos em meio de cultura e em tubos contendo meio de cultura e água destilada estéril, foi adicionado 0,5 ml de inóculo na concentração de 2×10^5 trofozoítas/ml com 48h de cultivo. A seguir os tubos foram incubados em estufa a $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (+/- $0,5^\circ\text{C}$) por 48h. Deste modo obtivemos as seguintes concentrações finais de extratos: 10,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml e 0,3125 mg/ml.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Após 48 h de incubação em estufa a 37,0 °C (+/- 0,5°C) das culturas contendo os extratos em diluições sucessivas e os tubos controles, foram realizados exames microscópicos direto a fresco de cada uma das culturas, objetivando-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento, quando não se constatava a presença de exemplares vivos de *T. vaginalis*. A CIM foi representada como sendo a menor concentração do extrato que produziu a inibição do crescimento dos *T. vaginalis* (MICHE, 1878; LIMA, 1991).

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM)

Para cada extrato de planta testado nas diluições em que as culturas mostravam ausência de crescimento, ou seja a partir da CIM, promoveu-se o subcultivo das mesmas. As culturas foram então incubadas em estufa a 36,5 °C (+/- 0,5°C) por 48 horas. Após este período, foram realizados exames microscópicos direto a fresco das culturas para verificação da ausência ou não do crescimento dos *T. vaginalis*. A CLM foi considerada a menor concentração do extrato capaz de promover a morte dos parasitas (MICHE, 1978; LIMA, 1991, ANDREWS et al., 1994).

3.9 REPRODUTIBILIDADE DO TESTE DE DILUIÇÃO EM CALDO

Para verificação da reprodutibilidade da técnica de diluição em caldo empregada neste estudo, foram selecionadas aleatoriamente 3 das 20 cepas de *T. vaginalis*, que foram testadas em quintuplicata com todos extratos metanólicos (MICHE, 1978; LIMA, 1991).

4. RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *T. vaginalis*

Foram isoladas em meio de Diamond modificado 32 cepas de *T. vaginalis* a partir das secreções vaginais. Foram mantidas no mesmo meio, 20 cepas pois 12 cepas morreram após o segundo ou terceiro repique.

4.2 VALORES DE CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS (ea) PELA TÉCNICA DE PERDA POR DESSECAÇÃO

Na Tabela 2 estão expressos os valores de concentração em g/ml dos extratos das plantas, obtidos pela técnica de determinação de perda por dessecação.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE PLANTAS MEDICINAIS PELA TÉCNICA DA DILUIÇÃO EM CALDO

4.3.1 Reprodutibilidade da técnica

Para análise da reprodutibilidade da técnica de diluição em caldo, foram testadas as cepas: LACT 1 , JI 2 e JI 4. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

4.3.2 Resultados dos testes de sensibilidade *in vitro*

As cepas de *T. vaginalis* mostraram variabilidade no comportamento frente aos diferentes extratos estudados, em termos de concentração inibitória mínima. O extrato metanólico que apresentou maior atividade, foi aquele obtido da planta *M. charantia* com CIM de 0,625 e 1,25 mg/ml. Constatamos que 17 cepas tiveram a CIM de 1,25 mg/ml e 3 cepas a CIM de 0,625 mg/ml. O extrato de *C. officinalis* foi o segundo que apresentou maior atividade, com valores de CIM de 2,5 e 5 mg/ml, sendo que 19 cepas tiveram CIM de 5mg/ml e 1 cepa de 2,5 mg/ml. O extrato de *M. rotundifolia* apresentou atividade nas concentrações de 5 ou 10 mg/ml para 13 cepas, sendo que para 7 cepas a CIM foi maior que 10 mg/ml. O extrato de *A. annua* apresentou atividade na concentração de 10 mg/ml para 7 cepas ,sendo que para 13 cepas a CIM foi maior que 10 mg/ml. O extrato de *S.officinalis* apresentou valor de CIM de 10 mg/ml para 06 cepas, sendo que para 14 cepas, a maior concentração testada não apresentou efeito inibitório sobre os parasitas. O extrato de *B. pilosa* não produziu efeito contra as cepas de *T. vaginalis*, na maior concentração testada. Os resultados dos valores de CIM estão representados na Tabela 5.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM) DE EXTRATOS METANÓLICOS DE PLANTAS MEDICINAIS PELA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM CALDO

4.4.1 Reprodutibilidade da técnica

Para análise da reprodutibilidade da técnica de diluição em caldo foram utilizadas as cepas LACT 1, JI 2 e JI 4. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

4.4.2 Resultados dos testes de sensibilidade *in vitro*

As cepas de *T. vaginalis* mostraram variabilidade no comportamento frente aos diferentes extratos de plantas estudados, em termos de concentração letal mínima (CLM). Os resultados dos valores de CLM estão sumariados na Tabela 6. Os valores da CLM foram coincidentes com os valores de CIM.

TABELA 2 Concentração dos extratos (ea) das plantas, pela técnica de perda por dessecação

Peso g/ml	Extratos*					
	ea1	ea2	ea3	ea4	ea5	ea6
1º determinação	0,1284	0,0947	0,0830	0,0743	0,0718	0,1178
2º determinação	0,1262	0,0894	0,0814	0,0756	0,0680	0,1166
Média	0,1272	0,0920	0,0822	0,0749	0,0699	0,1172

*Extratos:

ea1 = *A. annua*, ea2= *B.pilosa*, ea3= *C. officinalis*, ea4=*M. rotundifolia*; ea5=*M. charantia*,

ea6 = *S.officinalis*

TABELA 3 Reprodutibilidade da técnica de diluição em caldo: Prova de sensibilidade *in vitro* de *T. vaginalis* frente a extratos metanólicos de plantas medicinais. Valores expressos em termos de concentração inibitória mínima (CIM) em mg/ml

CEPAS	Determinações	CIM (mg/ml) dos extratos*					
		ea1	ea2	ea3	ea4	ea5	ea6
LACT1	1°	10	>10	5	5	0,625	10
	2°	10	>10	5	2,5	1,25	10
	3°	10	>10	5	2,5	1,25	10
	4°	10	>10	5	5	1,25	10
	5°	10	>10	5	5	0,625	10
JI2	1°	10	>10	5	5	1,25	10
	2°	>10	>10	5	5	1,25	>10
	3°	10	>10	5	5	1,25	10
	4°	>10	>10	5	5	1,25	10
	5°	>10	>10	5	5	1,25	10
JI4	1°	10	>10	5	5	1,25	10
	2°	10	>10	5	10	1,25	10
	3°	10	10	5	5	1,25	10
	4°	10	>10	5	5	1,25	10
	5°	10	10	5	5	1,25	10

*Extratos:

ea1= *A.annua*; ea2 = *B. pilosa*; ea3 = *C. officinalis*; ea4= *M. rotundifolia*; ea5= *M.charantia*;

ea6 = *S.officinalis*.

TABELA 4 Reprodutibilidade da técnica de diluição em caldo: Prova de sensibilidade *in vitro* de *T. vaginalis* frente a extratos metanólicos de plantas medicinais. Valores expressos em termos de concentração letal mínima (CLM) em mg/ml

CEPAS	Determinações	CLM (mg/ml) dos extratos*					
		ea1	ea2	ea3	ea4	ea5	ea6
LACT1	1°	10	>10	5	5	0,625	10
	2°	10	>10	5	2,5	1,25	10
	3°	10	>10	5	2,5	1,25	10
	4°	10	>10	5	5	1,25	10
	5°	10	>10	5	5	0,625	10
JI2	1°	10	>10	5	5	1,25	10
	2°	>10	>10	5	5	1,25	>10
	3°	10	>10	5	5	1,25	10
	4°	>10	>10	5	5	1,25	10
	5°	>10	>10	5	5	1,25	10
JI4	1°	10	>10	5	5	1,25	10
	2°	10	>10	5	10	1,25	10
	3°	10	10	5	5	1,25	10
	4°	10	>10	5	5	1,25	10
	5°	10	10	5	5	1,25	10

*Extratos:

ea1= *A. annua*; ea2 = *B. pilosa*; ea3 = *C. officinalis*; ea4= *M. rotundifolia*; ea5= *M. charantia*;

ea6 = *S. officinalis*.

TABELA 5 Resultados das provas de sensibilidade *in vitro* de *T. vaginalis* frente aos extratos metanólicos (ea) de plantas. Valores expressos em termos de concentração inibitória mínima (CIM)

CEPAS	CIM (mg / ml) dos extratos (ea)*					
	ea1	ea2	ea3	ea4	ea5	ea6
LACT 1	10	>10	5	5	1,25	10
LACT 2	10	>10	5	5	1,25	10
CBI 1	>10	>10	5	10	1,25	>10
CBI 2	>10	>10	5	10	1,25	>10
LACT 3	>10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 1	10	>10	5	5	1,25	10
JI 3	>10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 2	>10	>10	5	5	1,25	10
LACT 4	10	>10	2,5	5	1,25	>10
CBI 4	>10	>10	5	>10	1,25	>10
CBI 5	>10	>10	5	10	0,625	>10
ITAT 1	>10	>10	5	>10	1,25	>10
ITAT 2	10	>10	5	10	1,25	10
LACT 5	>10	>10	5	>10	1,25	>10
LUTZ 2	>10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 4	10	>10	5	5	1,25	10
LUTZ 1	>10	>10	5	10	0,625	>10
LACT 6	>10	>10	5	10	1,25	>10
LUTZ 7	10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 6	>10	>10	5	10	0,625	>10

* Extratos:

ea1 = *A. annua*; ea2 = *B. pilosa*; ea3 = *C. officinalis*; ea4 = *M. rotundifolia*; ea5 = *M. charantia*;

ea6 = *S. officinalis*.

TABELA 6 Resultados das provas de sensibilidade *in vitro* de *T. vaginalis* frente aos extratos metanólicos (ea) de plantas. Valores expressos em termos de concentração letal mínima (CLM)

CEPAS	CLM (mg / ml) dos extratos (ea)*					
	ea1	ea2	ea3	ea4	ea5	ea6
LACT 1	10	>10	5	5	1,25	10
LACT 2	10	>10	5	5	1,25	10
CBI 1	>10	>10	5	10	1,25	>10
CBI 2	>10	>10	5	10	1,25	>10
LACT 3	>10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 1	10	>10	5	5	1,25	10
JI 3	>10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 2	>10	>10	5	5	1,25	10
LACT 4	10	>10	2,5	5	1,25	>10
CBI 4	>10	>10	5	>10	1,25	>10
CBI 5	>10	>10	5	10	0,625	>10
ITAT 1	>10	>10	5	>10	1,25	>10
ITAT 2	10	>10	5	10	1,25	10
LACT 5	>10	>10	5	>10	1,25	>10
LUTZ 2	>10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 4	10	>10	5	5	1,25	10
LUTZ 1	>10	>10	5	10	0,625	>10
LACT 6	>10	>10	5	10	1,25	>10
LUTZ 7	10	>10	5	>10	1,25	>10
JI 6	>10	>10	5	10	0,625	>10

*Extratos:

ea1 = *A. annua*; ea2 = *B. pilosa*; ea3 = *C. officinalis*; ea4 = *M. rotundifolia*; ea5 = *M. charantia*;

ea6 = *S. officinalis*.

5. DISCUSSÃO

O interesse crescente pelos medicamentos de origem vegetal, pode ser medido através da sua participação no arsenal terapêutico de vários países (SHARAPIN, 1993). Cerca de 50% de todas as formulações de drogas comercializadas em países industrializados são derivadas de produtos de origem natural (BRUHN, 1989). Em decorrência deste mercado em franca expansão, muitos projetos de pesquisa têm sido realizados, no sentido de se buscar nos vegetais superiores novos compostos biologicamente ativos.

A pesquisa com plantas medicinais é permeada por fatores que envolvem a interdisciplinariedade (MALONE, 1983; HOLMESTED, 1991; ELISABETSKY & WANNMACHER, 1993; WALLER, 1993). O tema é ainda polêmico, especialmente no que se refere às estratégias a serem adotadas quanto aos tipos de extrato a serem preparados, aos modelos empregados e à posologia usada popularmente. (DI STASI, 1995).

A procura de novos compostos potencialmente ativos para protozoários pode ser iniciada pela investigação na medicina tradicional de plantas utilizadas para o tratamento das doenças parasitárias (SPENCER et al., 1947; WRIGHT et al., 1988; FOURNET et al., 1994; LEAMAN et al., 1995). As pesquisas de novas drogas de origem natural ou sintéticas para o tratamento da malária, leishmaniose, amebíase e tripanossomose são aceleradas em decorrência da elevada morbidade e mortalidade que estas doenças determinam, bem como pela resistência desenvolvida por algumas cepas destes parasitas à

medicação disponível (PHILLIPSON & WRIGHT, 1991a ; PHILLIPSON & WRIGHT , 1991b).

A investigação mais extensa de vegetais superiores com ação antiprotozoários foi publicada por SPENCER et al. em 1947. Extratos de 600 espécies de plantas foram testados para atividade antimalárica avícola. Muitas destas plantas foram selecionadas de acordo com o uso popular e as investigações fizeram parte de uma pesquisa maciça, para a procura de novas formas alternativas ao tratamento convencional com quinina, durante a segunda guerra mundial. Os testes foram realizados *in vivo* em galinhas e patos com *Plasmodium gallinaceum* , *Plasmodium cathemerium* e *Plasmodium lophurae*. Vários extratos mostraram atividade e em particular os provenientes das famílias Amaryllidaceae e Simaroubaceae. Entretanto, o valor preditivo destes testes de triagem com malária avícola, para o *Plasmodium falciparum* ou outros plasmódios causadores da malária humana é desconhecido. Em 1947 não haviam técnicas espectrofotométricas e cromatográficas sofisticadas disponíveis para a separação, isolamento e determinação da estrutura de produtos naturais presentes em misturas complexas, bem como não haviam condições de cultivo de *P. falciparum in vitro* em eritrócitos humanos, que só ocorreu em 1976 (PHILLIPSON & WRIGHT, 1991 a ; PHILLIPSON & WRIGHT, 1991 b). Posteriormente em 1979, DESJARDINS et al. descreveram uma técnica de microdiluição, usando *P. falciparum* cultivados em eritrócitos humanos, possibilitando os ensaios *in vitro* que continuam sendo utilizados até o presente.

Os medicamentos usuais disponíveis para o tratamento da tricomoníase podem ter sua eficácia comprometida, à medida que algumas cepas de *T. vaginalis* desenvolvem resistência aos grupos nitroimidazólicos presentes

nestes fármacos (MEINGASSNER & THURNER, 1979; FORSGREEN & FORSMANN, 1979; KULDA et al., 1982; LOSSICK et al., 1986). Esta resistência pode estar relacionada à presença de oxigênio, que impede a captação da droga pelo parasita (LOSSIK, 1990; JOHNSON, 1993) ou à diminuição da transcrição do gene da transferrina, responsável pela ativação do metronidazol. Nos trabalhos realizados por QHON et al. (1992) foi constatada diminuição de 50 a 65% nos níveis de ferredoxina, em cepas resistentes aos nitroimidazólicos representando resistência fenotípica.

As pesquisas com plantas medicinais potencialmente ativas para infecção causada por *T. vaginalis* são escassas. Possivelmente, porque o parasitismo deste protozoário não determine êxito letal ao hospedeiro. Entretanto, devemos considerar que esta doença parasitária apresenta elevada morbidade (ALDERETE et al., 1995), o que também justifica o investimento no estudo de novos compostos para o tratamento da tricomoníase. Neste sentido, a proposta deste trabalho foi avaliar a atividade tricomonocida *in vitro* de extratos metanólicos obtidos de espécies vegetais, utilizadas na medicina popular.

Para a seleção de espécies vegetais potencialmente ativas biologicamente, três tipos distintos de abordagem podem ser utilizadas. A randômica, que seleciona espécies aleatoriamente, sem adotar qualquer critério específico; a quimiotaxonômica ou filogenética, que relaciona as espécies de acordo com a ocorrência de classes químicas de substâncias em um gênero ou família; e a etnofarmacológica, que seleciona plantas de acordo com o uso terapêutico referido por um determinado grupo étnico (DI STASI, 1995). Neste trabalho foi adotado o critério de seleção etnofarmacológico. De acordo com alguns autores, este é o método de seleção do material vegetal, que oferece

maior margem de sucesso para a descoberta de novos princípios biologicamente ativos (MALONE, 1983; DI STASI, 1995). Assim, através da revisão da literatura foram selecionadas algumas espécies de plantas, em função do uso na medicina popular para o tratamento da leucorréia e das parasitoses (COIMBRA, 1958; CORRÊA, 1984; VON HERTIG, 1986; PEREIRA et al., 1988; DI STASI et al., 1989; HIRSCHMANN & ARIAS, 1990; POLUNIN & ROBINS, 1993; CORRÊA Jr. et al., 1994). Pudemos constatar que são numerosas as espécies de plantas empregadas nestes tratamentos. Entretanto, muitas delas são de difícil acesso, quer seja pelas características exigidas para o cultivo de algumas espécies, como pelo caráter regionalista de distribuição geográfica das mesmas e sazonalidade. Sendo assim, as espécies de plantas selecionadas para a execução deste trabalho foram : *Artemisia annua* (artemísia), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Calêndula officinalis* (calêndula), *Mentha rotundifolia* (hortelã da folha redonda), *Momordica charantia* (melão de São - Caetano) e *Salvia officinalis* (sálvia ou salva das boticas). As plantas *A. annua* e *M. rotundifolia* foram selecionadas por serem usadas popularmente no Brasil e em outros países para o tratamento de doenças parasitárias (PEI-GEN & SHAN-LIN, 1986; HIRSCHMANN & ARIAS, 1990; WHITE, 1994; CORRÊA Jr. et al., 1994; MAGALHÃES, 1996). As plantas *S. officinalis* e *C. officinalis* foram selecionadas por serem popularmente usadas no tratamento da leucorréia (COIMBRA, 1958; VON HERTIG, 1986), que é a manifestação clínica mais freqüentemente observada em mulheres parasitadas por *T. vaginalis* (HONIGBERG, 1978; KRIEGER et al., 1990; REY, 1991; SARDANA et al., 1994). As plantas *M. charantia* e *B. pilosa* foram ensaiadas, por serem indicadas na medicina popular, para o tratamento da leucorréia e de helmintoses (COIMBRA, 1958; N'DOUNGA et al., 1983; CORRÊA, 1984;

PEREIRA et al., 1988; DI STASI et al., 1989; HIRSCHMANN & ARIAS, 1990; GIRON et al., 1991).

A natureza é um laboratório com muitas possibilidades, principalmente quando se refere às pesquisas farmacológicas com plantas medicinais (DI STASI, 1995). Os vegetais que constituem a matéria prima para a produção de fitofármacos, apresentam variações no teor de princípios ativos, dependentes de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos (BROWN, 1988). Dentre os fatores intrínsecos, temos aqueles inerentes ao próprio vegetal como: variações hormonais, ritmos estacionais ou circadianos. Dentre os fatores extrínsecos, temos os climáticos e os edáficos. A maioria destes compostos biologicamente ativos são em geral produtos ou subprodutos do metabolismo secundário das plantas e constituem respostas dos mecanismos de integração destas com o seu ambiente (BROWN, 1988). Sendo assim, quando a perspectiva é o cultivo de vegetais para fins medicinais, cuidados com a época e forma da colheita, com as condições climáticas e de plantio e com a secagem do material, devem ser considerados. A não observação destes fatores que eventualmente bloqueiem os caminhos biossintéticos dos vegetais deve resultar em apreciável perda da atividade biológica nas plantas medicinais cultivadas (BROWN, 1988). Assim, neste estudo adotamos os cuidados relativos à coleta e processamento do material botânico recomendados por DI STASI (1995).

Vários tipos de solventes podem ser utilizados para a extração de substâncias farmacologicamente ativas presentes nos vegetais superiores. A escolha do tipo de extrato a ser utilizado é facilitada, quando já se tem o conhecimento do perfil fitoquímico das substâncias que se pretende extrair (DI STASI, 1995). No entanto, quando se seleciona plantas de acordo com critérios

etnofarmacológicos, é conveniente a utilização de líquidos extratores com elevada polaridade, uma vez que, na maioria das vezes a população emprega formas farmacêuticas obtidas por infusões e decocções destas plantas medicinais (DI STASI, 1995).

OGUNLANA & RAMSTAD (1975) ; JAFFER et al.(1988); GIRON et al. (1988); HAKIZAMUNGU et al. (1992); FOURNET et al. (1994) e LEAMAN et al. (1995) utilizaram extratos alcoólicos (etanólicos ou metanólicos) para avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* de plantas medicinais frente a parasitas, bactérias, fungos e vírus. Na literatura consultada, constatamos que as plantas *A. annua*, *B.pilosa*, *C.officinalis*, *M.rotundifolia*, *M. charantia* e *S. officinalis* são usadas tradicionalmente sob a forma de chás (infusos e / ou decoctos). Em estudos preliminares realizados por nós, com extratos hidroalcoólicos (etanol a 70%), constatamos dificuldade na solubilização dos mesmos, quando em contato com o meio de cultura de Diamond. Utilizamos os tensoativos Tween 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) em várias concentrações e não obtivemos a solubilização adequada dos extratos no meio de cultura de Diamond. Assim, optamos por empregar o metanol como líquido extrator, por garantir o arraste de grande número de substâncias polares presentes nos vegetais. Em adição, estes extratos apresentaram total solubilização no meio de cultura de Diamond.

OGUNLANA & RAMSTAD (1975); WRIGHT et al. (1988); HAKIZAMUNGU et al. (1992) e SAHPAZ et al. (1994) estudaram a atividade *in vitro* de plantas contra vários protozoários e outros microrganismos, empregando extratos metanólicos em seus experimentos.

Os extratos metanólicos podem ser obtidos por várias metodologias de extração. Segundo PRISTA (1981) e WILLIAMSON et al. (1996)

o processo de extração em aparelho do tipo Soxhlet apresenta bom rendimento, requerendo pequeno volume de solvente para a extração dos constituintes químicos do vegetal.

As concentrações de extratos de plantas empregadas para os testes de atividade *in vitro* contra microrganismos, variam na ordem de $\mu\text{g/ml}$ a mg/ml , conforme pudemos constatar na literatura (OGUNLANA & RAMSTAD, 1975 ; WRIGHT et al., 1988; JAFFER et al.,1988; GIRON et al., 1988; HAKIZAMUNGU et al., 1992; FOURNET et al., 1994; LEAMAN et al., 1995). Assim, adotamos neste estudo, as seguintes concentrações: 10mg, 5,0mg, 2,5mg, 1,25mg, 0,625mg, 0,3125mg/ml. O estabelecimento das concentrações empregadas foram decorrentes de ensaios preliminares.

Vários meios de cultura foram propostos para o cultivo de *T. vaginalis* e seu emprego no diagnóstico, isolamento, manutenção, estudos de sensibilidade a medicamentos e a fatores nutricionais têm fornecido resultados diversos e às vezes contraditórios, segundo diferentes autores (DIAMOND, 1957; JIROVEC & PETRU, 1968 ; MICHE, 1978; FOUTS & KRAUS, 1980; DRAPER et al.,1993).

De modo geral, os meios de cultura usados para o cultivo de *T. vaginalis* podem ser divididos em meios contendo soro e meios sem soro. Os meios contendo soro mais utilizados são: CPLM (cisteína, peptona de fígado e maltose), STS (soro tripticase modificado) e de DIAMOND, em suas formulações originais ou com modificações (MICHE, 1978). Os meios sem soro contêm, habitualmente, pequenos pedaços de carne ou de fígado de animais, sendo muito pouco utilizados, em razão de sua menor eficiência em relação aos meios contendo soro (MICHE, 1978).

Em nosso trabalho adotamos o meio de DIAMOND modificado por MICHE, (1978) por julgarmos adequados os resultados obtidos pela autora, quanto ao isolamento e manutenção das cepas de *T. vaginalis*.

As provas de sensibilidade de um microrganismo a antibióticos e a quimioterápicos podem ser realizadas *in vitro* e *in vivo*. As provas *in vitro* podem ser efetuadas por meio de técnicas de diluição ou de difusão (MICHE, 1978).

Em técnicas de diluição, meios contendo concentrações variadas de antibióticos, quimioterápicos ou extratos de plantas são inoculados com o microrganismo. Após incubação adequada, a menor concentração da substância que resultar em completa inibição do microrganismo é considerada como concentração inibitória mínima (CIM) (MICHE, 1978).

A metodologia da diluição em caldo é considerada padrão para estudo da atividade *in vitro* de medicamentos ou de extratos de plantas frente a microrganismos (MICHE, 1978 ; KULDA et al.,1982 ; HAKIZAMUNGU et al., 1992 ; GASQUET et al., 1992 ; ANDREWS et al. 1994).

Os inóculos utilizados nos testes foram preparados a partir de culturas de *T. vaginalis* mantidas em estufa à 37°C por períodos de 48 horas de incubação (N'DOUNGA et al.,1983 ; HAKIZAMUNGU et al., 1992). O número de formas trofozoíticas (2×10^5) inoculadas no meio de cultura, foram da mesma ordem de grandeza que os autores MICHE (1978); KULDA et al. (1982); JULIANO et al.(1986) e WANG (1993) adotaram em seus trabalhos.

A reprodutibilidade da técnica de diluição em caldo, expressa em termos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM), mostrou-se satisfatória. Conforme podemos observar os resultados

expressos na Tabela 3, o número de determinações não coincidentes para todos os extratos foi muito pequeno, não excedendo de 3 para cada planta estudada. Os valores de CIM foram coincidentes com os valores de CLM em todos os extratos testados (Tabela 3 e 4).

De acordo com os resultados expressos na Tabela 5, podemos observar a intensa atividade *in vitro* do extrato de *M. charantia*, com valores de CIM de 0,625 e 1,25mg/ml. Estes resultados foram similares aos obtidos com os extratos metanólicos da planta *Momordica foetida*, que é uma espécie do mesmo gênero de *M. charantia*, em trabalho realizado por HAKIZAMUNGU et al. (1992). Estes autores constataram atividade tricomonocida do extrato metanólico das folhas de *M. foetida* na concentração de 1mg/ml. A planta *M. charantia* é utilizada na medicina tradicional de vários países. Na China utilizam-se os frutos e sementes de *M. charantia* como antiviral, antitumoral e para aumentar a imunidade. Na Ásia, África e América Central, os frutos são usados como hipoglicemiante oral. DAY et al. (1990) estudando a atividade do extrato aquoso de *M. charantia* e do resíduo após extração alcalina com clorofórmio, em animais diabéticos, constataram que os mesmos produziram atividade hipoglicemiante, independente da absorção intestinal de glicose e da secreção de insulina. Os autores sugeriram a presença de pelo menos dois tipos de hipoglicemiantes orais ativos, presentes em *M. charantia*: um hidrossolúvel, rapidamente efetivo e outro de ação mais lenta, possivelmente um alcalóide. Recentemente muitas proteínas foram isoladas a partir de extratos das sementes de *M. charantia* (LEE- HUANG et al., 1990). Estas proteínas pertencem ao grupo de proteínas de cadeia simples inativadoras de ribossomas. Atuam inibindo *in vitro* a translação de células eucariotas pela inativação catalítica da subunidade ribossomal 60S. Outros

estudos demonstraram que estas proteínas atuam na multiplicação do vírus Herpes simples (HSV-1) e do poliovírus 1 em células Hep -2. LEE - HUANG et al. (1990) isolaram e purificaram a proteína anti-HIV, MAP 30, das sementes e frutos de *M. charantia*. Esta proteína de 30 K Da foi capaz de inibir a infecção e replicação do vírus HIV - 1 em linfócitos T e monócitos sendo considerada potencialmente útil no tratamento de indivíduos infectados pelo HIV. Apesar da vasta gama de estudos de atividade biológica com *M. charantia*, na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre a atividade tricomonocida da mesma.

Nas Tabelas 5 e 6 podemos observar que o extrato de *C. officinalis* apresentou atividade tricomonocida em concentrações de 2,5 e 5 mg/ml. LAUS et al. (1994) trataram 20 pacientes apresentando tricomoníase, com creme vaginal a base de *C. officinalis* a 10%. Encontraram cura clínica e laboratorial em 55% dos casos. As propriedades antiinflamatórias presentes no óleo obtido das sementes de *C. officinalis* contêm ácidos graxos insaturados, que podem interferir no metabolismo do ácido aracônico e, conseqüentemente, com a produção de importantes mediadores da inflamação de acordo com o trabalho realizado por DELLA LOGIA et al. (1991). Os triterpenóides presentes nas flores da planta, também apresentaram atividade antiinflamatória em estudos realizados por DELLA LOGIA et al. (1994). Estas propriedades antiinflamatórias seriam úteis, de acordo com LAUS et al. (1994), pois contribuiria na recuperação da mucosa vaginal, freqüentemente hiperemiada (REY, 1991) em decorrência do parasitismo ocasionado por *T. vaginalis*. Os principais constituintes químicos de *C. officinalis* são glicosídeos sesquiterpênicos e saponinas triterpênicas, presentes nas partes aéreas da planta e ácidos graxos insaturados, encontrados

no óleo obtido das sementes de calêndula. Os glicosídeos sesquiterpênicos isolados de *C. arvensis*, mostraram atividade antiviral *in vitro*, principalmente contra o vírus da estomatite vesicular, em trabalhos descritos por DE TOMASI et al. (1990) e DE TOMASI et al. (1991). Segundo PHILLIPSON & WRIGHT (1991a), várias substâncias sesquiterpênicas presentes em alguns vegetais superiores apresentam atividade contra vários protozoários dos gêneros: *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* e *Toxoplasma*. Entretanto, na literatura consultada, não encontramos estudos sobre a atividade destas substâncias sesquiterpênicas frente a *T. vaginalis*.

Nas tabelas 5 e 6, podemos observar que o extrato de *M. rotundifolia* apresentou atividade nas concentrações de 5 e 10 mg/ml para 13 cepas. Entretanto para 7 cepas, não foi observada atividade inibitória na maior concentração testada. Apesar da população utilizar a hortelã na forma de chás, a grande concentração de compostos potencialmente ativos, está presente no óleo essencial das várias espécies do gênero *Mentha*. Assim, SINGH et al. (1992) demonstraram atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial de *Mentha arvensis* e GUERIN & REVEILLERE (1985) verificaram a ação fungicida do óleo essencial de *Mentha piperita*. O óleo essencial de *M. rotundifolia* apresenta óxido de piperitenona, mentol, limineno, cineol, acetato de metila, mentona, isomentona, que também estão presentes em outras espécies de *Mentha* (COSTA, 1975; KOKKINI & PAGAGEORGIU, 1988). Considerando-se que grande parte dos estudos sobre atividade biológica de várias espécies do gênero *Mentha* foram realizados com o óleo essencial, podem-se justificar os resultados por nós obtidos, uma vez que utilizamos o extrato bruto da *M. rotundifolia*.

O extrato de *A. annua* produziu atividade na concentração de 10 mg/ml em 7 das 20 cepas testadas (Tabelas 5 e 6). A artemisinina, principal princípio ativo antimalárico presente em *A. annua* , é uma lactona sesquiterpênica que possui um grupamento endoperóxido, sem o qual torna - se inativa (PHILIPSON & WRIGHT 1991a; PHILLIPSON & WRIGHT, 1991 b; JANICK, 1995; MAGALHÃES, 1996). Apresenta natureza lipofílica, sendo extraída em solventes menos polares, tais como hexano. As quantidades de artemisinina presente nas folhas de *A. annua* são variáveis de 0,01 a 1% (MAGALHÃES, 1996). Selecionamos a *A. annua* para este trabalho, por hipotetizarmos que a artemisinina pudesse exercer ação tricomonocida, visto que é um potente protozoocida antimalárico, e por verificarmos no trabalho realizado por HAKIZAMUNGU et al. (1992), que de 21 espécies de plantas usadas tradicionalmente em Rwanda como antimalárico, 10 apresentaram atividade tricomonocida *in vitro* na concentração de 1 mg/ml. Apesar de termos trabalhado com extratos brutos e não com princípios ativos purificados, nossos resultados demonstraram que para as concentrações testadas, a *A. annua* não apresentou atividade satisfatória em comparação com a *M. charantia* e *C. officinalis*.

Em relação à planta *B. pilosa* , a maior concentração do extrato por nós testada (10 mg/ml) não produziu efeito tricomonocida, conforme podemos observar nas Tabelas 5 e 6 . Um grande número de substâncias presentes em *B. pilosa* foram isoladas e identificadas, principalmente poliacetilenos , derivados tiofenos e várias chalconas (HOFFMANN & HÖLZL, 1988a, HOFFMANN & HÖLZS, 1988b). Dentre elas, destacou-se um composto poliacetilênico, o fenilheptatrieno, que apresentou atividade antimicrobiana, antifúngica , anti - helmíntica, protozoocida e cercaricida (N' DOUNGA et al., 1983; GEISSBERGER

& SÉQUIN, 1991). N'DOUNGA et al. (1983) testaram *in vitro* a atividade do fenilheptatrieno obtido das partes aéreas de *B. pilosa* contra helmintos e *T. vaginalis*. Os autores verificaram que a CIM do fenilheptatrieno para *T. vaginalis* foi de 100 µg/ml . O fenilheptatrieno é um composto isolado a partir de frações insolúveis em água, provenientes do extrato metanólico (N'DOUNGA et al., 1983). No presente trabalho, não utilizamos as frações insolúveis em água, o que poderia ser uma das hipóteses que justificaria a ausência de atividade que *B. pilosa* apresentou com as cepas ensaiadas.

As folhas de *S. officinalis* apresentam cerca de 1 a 2,5 % de óleos essenciais, sendo a tujona, o principal constituinte do óleo (GIACHETTI et al., 1988 ; AMARAL et al., 1996). As propriedades medicinais da *S. officinalis* são atribuídas principalmente aos óleos essenciais e aos flavonóides, presentes em suas folhas (VON HERTIG 1986; AMARAL et al., 1996). Na revisão da literatura não encontramos estudos desta planta relativos à atividade antiparasitária. Ela é utilizada pela população para o tratamento específico da leucorréia (COIMBRA, 1958). Entretanto, conforme podemos verificar nas Tabelas 5 e 6, o extrato de *S. officinalis* inibiu 6 cepas na concentração inibitória mínima de 10 mg/ml, sugerindo que novos estudos devam ser realizados com esta espécie de planta.

Cabe ressaltar que este trabalho foi pioneiro, no que tange ao estudo *in vitro* de extratos metanólicos das plantas *A. annua*, *B. pilosa*, *C. officinalis*, *M. rotundifolia*, *M. charantia* e *S. officinalis*, visando a atividade tricomonocida. Norteados pelos resultados de nossos experimentos, sugerimos que trabalhos mais amplos devam ser realizados, incluindo-se maior número de cepas de *T. vaginalis*, outros tipos de extratos, isolamento e purificação de

compostos tricomonocidas, testes *in vitro* e *in vivo*, antes de se indicar o uso destas plantas no combate a tricomoníase.

6. CONCLUSÕES

1. O meio de cultura de Diamond modificado por MICHE mostrou-se eficiente para o isolamento e a manutenção das cepas de *T. vaginalis*.
2. O meio de cultura de Diamond modificado por MICHE mostrou-se adequado para o estudo da atividade tricomonocida dos extratos metanólicos das plantas.
3. A técnica da diluição em caldo mostrou-se apropriada para o estudo *in vitro* da atividade tricomonocida de extratos metanólicos obtido de vegetais superiores.
4. Os extratos metanólicos das espécies vegetais estudadas apresentaram total solubilização em água, não havendo precipitação do mesmo quando em contato com o meio de cultura de Diamond.
5. Os extratos de *M. charantia* e *C. officinalis* foram ativos contra todas as cepas estudadas.
6. O extrato de *M. charantia* foi o que apresentou melhor atividade tricomonocida *in vitro*, com valores de CIM e CLM de 0,625 e 1,25 mg/ml; seguido do extrato de *C. officinalis*, que apresentou efeito inibitório para *T. vaginalis* em concentrações de 2,5 e 5 mg/ml.

7. O extrato metanólico de *B. pilosa* não apresentou efeito tricomonocida na maior concentração testada (10mg/ml).

8. Os resultados destes experimento justificam uma investigação mais ampla das plantas *M. charantia* e *C. officinalis*, incluindo-se estudo fitoquímico para a identificação dos princípios biologicamente ativos para *T. vaginalis* presentes nestas espécies.

7. RESUMO

A tricomoníase, causada pelo protozoário *T. vaginalis*, é uma doença cosmopolita que apresenta elevada morbidade entre as mulheres sexualmente ativas. O parasitismo freqüentemente determina quadro clínico de vulvovaginite em mulheres. Nos homens a infecção costuma ser subclínica, podendo causar prostatite e próstato-vesiculite. O tratamento da tricomoníase é habitualmente efetuado com drogas derivadas dos nitroimidazólicos, embora casos de resistência a estes fármacos já tenham sido relatados. A cultura popular sempre se serviu das plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades e a eficácia de muitas substâncias isoladas a partir de vegetais superiores para o tratamento de várias parasitoses já foi comprovada. Alicerçados nestes relatos, a finalidade deste estudo foi avaliar a atividade *in vitro* de extratos metanólicos de plantas medicinais, usadas popularmente para o tratamento de parasitoses e/ou de leucorréia, frente a 20 cepas de *T. vaginalis*. As plantas selecionadas segundo critério etnofarmacológico foram: artemísia chinesa (*Artemisia annua*), picão-preto (*Bidens pilosa*), calêndula (*Calendula officinalis*), hortelã (*Mentha rotundifolia*), melão de São Caetano (*Momordica charantia*) e sálvia (*Salvia officinalis*). Foram realizados extratos metanólicos com estes vegetais através de extração em aparelho de Soxhlet e evaporação em rotaevaporador sob vácuo. As cepas de *T. vaginalis* foram isoladas de secreções vaginais de pacientes provenientes do município de Campinas-SP que apresentavam leucorréia. As mesmas foram mantidas em meio de cultura de Diamond modificado por MICHE (1978), em estufa a 37°C, com repiques

sucessivos em intervalo de 72h. Para a determinação da atividade tricomonocida (Concentração inibitória mínima - CIM e concentração letal mínima - CLM) dos extratos metanólicos das plantas, foi empregada a técnica de diluição em caldo. Para o ensaio foram inoculadas 2×10^5 trofozoítas/ml de meio. As concentrações dos extratos metanólicos utilizadas para determinar a CIM e CLM foram: 10; 5,0 ; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125mg/ml. Todos os extratos metanólicos, com exceção de extrato de *B. pilosa* apresentaram atividade *in vitro* para *T. vaginalis*. O extrato metanólico de *M. charantia* foi o que apresentou melhor atividade com CIM e CLM variando entre 0,625 e 1,25mg/ml para todas as cepas, seguido do extrato de *C. officinalis* que apresentou efeito tricomonocida nas concentrações de 2,5 e 5 mg/ml. Estes resultados sugerem que estudos mais amplos devam ser efetuados com estas espécies que apresentaram inibição em todas as cepas, na tentativa de se isolar e purificar os princípios ativos que sejam responsáveis pela ação tricomonocida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALDERETE, J. , LEHKER, M. W. , ARROYO, R. The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*.

Parasitol. Today, Amsterdam, v.11, n.2, p. 70 - 74, 1995.

AMARAL, A. L., POSSAMAI, J. C., ALQUIMI, Y. NAKASHIMA, T. Estudo botânico e .fitoquímico das folhas de *Salvia officinalis* . In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., Florianópolis, 1996. **Resumos** Florianópolis, 1996, p. 159.

ANDREWS, B.J., MYLVAGANAM, H., YULE,A. Sensitivity of *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus* and *Giardia intestinalis* to bacitracin and its zinc salt *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.88, p.704 -706, 1994.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1996.

BERTONI, B. W., MORO, J. R., PEREIRA, A.M.S., FRANÇA, S.C. Propagação clonal de *Calêndula officinalis*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., Florianópolis, 1996. **Resumos:** Florianópolis, 1996, p.41.

BRITO, A.R.M.S. In: Di STASI, L.C., SANTOS, E.M.G., SANTOS, C.M., HIRUMA, C.A **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Ed.Unesp, 1989. 194p.[Contracapa].

BRITO, A.R.M.S., BRITO, A. A. S. Forty years of brazilian medicinal plant research. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 39, p.53 -57, 1993.

BROWN, K. S. Jr. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. *Acta Amazônica*, Manaus, v.18, suppl. 1-2, p. 291- 303, 1988.

BRUHN, J. G. The use of natural products in modern medicine. *Acta Pharm. Nord.*, Stockholm, v.1, n.3, p. 117 - 129, 1989.

CARLSON, H.J., BISSEL, H.D. , MUELLER, M.G. Antimalarial and antibacterial substances separated from higher plants. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.52, p. 155 - 168, 1946.

COIMBRA , R. **Notas de fitoterapia** .2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo ,1958. 430p.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, IBDF, 1984. 6 vol.

CORRÊA Jr., C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 1994. 162p.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste, v.1, 1975, p.612-613.

COTCH, M.F., PASTOREK, J.G., NUGENT, R.P., YERG, D.E., MARTIN, D. H., ESCHENBACH, D.A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. *Obstet. Gynecol.*, Amsterdam, v.78, p.1087 - 1092, 1991.

CRUZ , F.S. A indústria farmacêutica no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 83,supl.1 , p.321 -329, 1988.

CUNHA, L.C. Quimioprofilaxia da doença de Chagas experimental: avaliação da atividade de *Zanthoxylum minutiflorum* Tul. *Rev. Patol. Trop.* ,Goiânia, v.24,n.1, p. 91- 192, 1995.

DANESH, I.S., STEPHEN, J.M., GORBACH, J. Neonatal *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Emerg. Med.*, v. 13, n. 1, p. 51 -54, 1995.

DAY, C., CARTWRIGHT, T., PROVOST, J., BAILEY, C.J. Hipoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts. *Planta Med.*, Stuttgart, v.56, p.426 -429, 1990.

DE KIMPE, N., SCHAMP, N., VAN PUYVELDE, L., DUBÉ, S., CHAGNON-DUBÉ, M., BORREMANS, F., ANTEUNIS, M.J.O. Isolation and structural identification of *Iboza riparia* *J. Org. Chem.*, Washington, v.47, n.19, p.3628 -3630, 1982.

DE TOMMASI, N., PIZZA, C., CONTI, C., ORSI, N., STEIN, M.L. Structure and *in vitro* activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.*, Cincinnati, v.53, n.6, p.830 - 835, 1990.

DE TOMMASI, N., CONTI, C., STEIN, M.L., PIZZA, C. Structure and *in vitro* antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.57, p.250 - 253, 1991.

DELLA LOGIA, R., SOSA, S., LEITNER, ZS., ISAAC, O., TUBARO, A. Anti-inflammatory activity of *Calendula* seed oil rich in ω -6 fatty acids. *Planta Med.*, Stuttgart, v.57, suppl.2, p.A49 - A50, 1991.

DELLA LOGIA, R., TUBARO, A., SOSA, S., BECKER, H., SAAR, S., ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, Stuttgart, v.60, n.6, p. 516 - 520, 1994.

DESJARDINS, R.E., CANFIELD, C.J., HAYNES, J.D., CHULAY, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.16, n.6, p.710 - 718, 1979.

DIAMOND, L.S. The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.43, p.488 - 490, 1957.

DI STASI, L.C., SANTOS, E.M.G., SANTOS, C.M., HIRUMA, C.A. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Ed. Unesp, 1989. 194p.

DI STASI, L.C., BACCHI, E.M., BRITO, A.R.M.S., MING, L.C., SAVASTANO, M.A. P., AMAROZZO, M.C.M., REIS, M.S., FERRI, P.H. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Ed. Unesp, 1995. 230p.

DRAPER, D., PARKER, R., PATTERSON, E., JONES, W., BEUTZ, M., FRENCH, J., BORCHARDT, K., MCGREGOR, J. Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with In Pouch TV culture system. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.31, n. 4, p.1016 - 1018, 1993.

ELISABETSKY, E., WANNMACHER, L., The status of ethnopharmacology in Brasil. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.38, p.137 -143, 1993.

FARMACOPÉIA brasileira . 4ed., São Paulo: Atheneu, 1988, pt.1.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants.

J. Pharm. Sci., Washington, v.55, p. 255 - 276, 1966.

FARNSWORTH, N. R. , AKERELE, O., BINGEL, A.S., SOEJARTO, D.D., GUO, Z.

Las plantas medicinales en la terapeutica. *Bol. Of. Sanit. Panam.*,

Washington, v. 107, n.4, p. 314 - 328, 1989.

FARNSWORTH, N. R. Ethnopharmacology and future drug development: the

North American experience. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.38, p.145 -

152, 1993.

FORSGREN, A., FORSSMAN, M. Metronidazole-resistant *Trichomonas*

vaginalis. *Br. J. Vener. Dis.*, London, v. 55, p. 351 - 353, 1979.

FOURNET, A., BARRIOS, A.A., MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal

activities of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.41, p.

19 - 37, 1994.

FOUTS, A.C., KRAUS, S.J. *Trichomonas vaginalis* reevaluation of its clinical

presentation and laboratory diagnosis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.141, n.2, p.

137 -143, 1980.

GARBER, G.E., LEMCHUCK-FAVEL, L.T. Association of production of cell -
detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*.

J. Clin. Microbiol., Washington, v.28, n.11, p. 2415 - 2417, 1990.

GASQUET, M., QUETIN-LECLERCQ, J., TIMON-DAVID, P., BALANSARD, G., ANGENOT, L. Antiparasitic properties of diploceline, a quaternary alkaloid from *Strychnos gossweileri*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.58, p.276 - 278, 1992.

GEISSBERGER, P., SÉQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L. : Do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Trop.*, Amsterdam, v.48, p.251 - 261, 1991.

GELBART, S.M., THOMASON, J.L., OSYPOWSKI, P.J., KELLETT, A.V., JAMES, J. A., BROEKHUIZEN, F.F. Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, n.5, p.962 -964, 1990.

GIACHETTI, D., TADDEI, E., TADDEI, I. Pharmacological activity of essential oils on Oddi's sphincter. *Planta Med.*, Stuttgart, v.54, p.389 - 392, 1988.

GIBBS, R.S., ROMERO, R., HILLIER, S.L., ESCHENBACH, D.A., SWEET, R. L. A review of premature birth and subclinical infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, St. Louis, v. 166, p. 1515 - 1528, 1992.

GIRÓN, L.M., AGUILLAR, G.A., CÁCERES, A., ARROYO, G.L. Anticandidal activity of plants used for the treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of *Solanum nigrescens* preparation. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.22, p. 307 - 313, 1988.

- GIRÓN, L.M., FREIRE, V., ALONZO, A., CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 34, p.173 -187, 1991.
- GUÉRIN, J.C., RÉVEILLÈRE, H.P. Activité antifongique de extraits végétaux à usage thérapeutique. II. étude de 40 extraits sur 9 souches fongiques. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.43, n.1, p. 77-81, 1985.
- HAKIZAMAMUNGU, E., VAN PUYVELDE, L., WÉRY, M., DE KIMPE, N., SCHAMP, N. Active principles of *Tetradenia riparia* III. Anti - *Trichomonas* activity of 8(14), 15- sandaracopimaradiene -7 α , 18 - diol. *Phytother. Res.*, London, v.2, n. 4, p. 207 - 208, 1988.
- HAKIZAMAMUNGU, E., VAN PUYVELDE, L., WÉRY, M. Screening of Rwandese medicinal plants for anti - *Trichomonas* activity. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.36, p. 143 -146, 1992.
- HARDY, P.H., HARDY, J.B., NELL, E. E., GRAHAM, D . A., SPENCE, M.R., ROSENBAUM, R.C. Prevalence of six sexually transmitted disease among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. *Lancet* , London, v.2, p.333 - 337, 1984.
- HEGNER, R.W., TAGLIAFERRO, W.H. **Human-protozoology**. New York : Macmillan , 1925, p.211-230.
-

HIRSCHMANN, G.S., ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.29, p.159 - 172, 1990.

HOFFMANN, B., HÖLZL, J. New chalcones from *Bidens pilosa*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.54, p.52 - 54, 1988a.

HOFFMANN, B., HÖLZL, J. A methylated chalcone glucoside from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, n.11, p.3700 - 3701, 1988b.

HOLMSTEDT, B. Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.32, p.7 - 24, 1991.

HONIGBERG, B.M. Trichomonads parasitic of importance in human medicine. In: KRIER, J.P., ed. **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1978. v.2, p.275 - 454.

JAFFER, H.J., MAHMOUD, M.J., JAWAD, A.M., NAJI, A., AL-NAIB, A. Phytochemical and biological screening of some Iraqi plants. *Fitoterapia*, Milano, v.59, n.3, p.229 - 233, 1988.

JANICK, J. Annual wormwood. Center for new crops & plant products, Purdue University. 1995. [Disponível na Internet : <http://newcrop.hort.purdue.edu/hort/newcrops/Crops/Cropfactsheets/artemisia.html>].

JIROVEC, O., PETRU, M. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. *Adv.*

Parasitol., London, v.6, p. 117 -188, 1968.

JOHNSON, P.J. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today*,

Amsterdam, v.9, n.5, p. 183 - 186, 1993.

JULIANO, C., MONACO, G., RUBINO, S., CAPPUCCINELLI, P. Inhibition of

Trichomonas vaginalis replication by the microtubule stabilizer taxol.

J. Protozool., Lawrence, v.33, n.2, p. 255 - 260, 1986.

KANEDA, Y., TORII, M., TANAKA, T., AIKAWA, M. *In vitro* effects of berberine

sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia*

lamblia and *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool,

v. 85,n.4, p. 417 - 425, 1991.

KENGNE, P., VEAS, F., VIDAL, N., REY, J.L., CUNY, G. *Trichomonas vaginalis*:

repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain

reaction diagnosis. *Cell. Mol. Biol.*, Oxford, v. 40, n. 6, p.819 - 831, 1994.

KOKKINI, S., PAPAGEORGIU, V.P. Constituents of essential oils from *Mentha*

X rotundifolia growing wild in Greece. *Planta Med.*, Stuttgart, v.54, p.166 -

167, 1988.

KRIEGER, J.N., WOLNER-HANSEN, P., STEVENS, C., HOLMES, K.K.

Characteristics of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without colpitis macularis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.161, p.307 - 311, 1990.

KRIEGER, J.N., VERDON, M., SIGEL, N., CRITCHLOW, C.W., HOLMES, K.K.

Risk assessment and laboratory diagnosis of trichomoniasis in men.

J. Infect. Dis., Chicago, v. 166, p. 1362 - 1366, 1992.

KRIEGER, J.N., JENNY, C., VERDON, M., SIGEL, N., SPRINGWATER, R.,

CRITCHLOW, C.W., HOLMES, K.K. Clinical manifestations of

trichomoniasis in men. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 118, p. 844 - 849, 1993a.

KRIEGER, J.N., VERDON, M., SIGEL, N., HOLMES, K.K. Natural history of

urogenital trichomoniasis in men. *J. Urol.*, Baltimore, v.149, p.1455 - 1458, 1993b.

KULDA, J., VOJTECHOVSKÁ, M., TACHEZY, J., DEMES, P., KUNZOVA, E.

Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis. *Br. J. Vener. Dis.*, London, v.58, p.394 - 399, 1982.

LAGA, M., MANOKA, A., KIVUVU, M., MALELE, B., TULIZA, M., NZILA, N.,
GOEMAN, J., BEHETS, F., BATTER, V., ALARY, M., HEYWARD, W.L.
RYDER, R.W., PIOT, P. Non - ulcerative sexually transmitted diseases as
risk factors for HIV - 1 transmission in women: results from a cohort study.
AIDS, London, v.7, p. 95 -102, 1993.

LAUS, C.B., URLIG, R. Tricomoniase vaginal : Calêndula(*Calêndula officinalis*)
& metronidazol. Avaliação clínica. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS
DO BRASIL, 13, Fortaleza, 1994. **Resumos:** Fortaleza, 1994. p.374.

LEAMAN, D.J., ARNASON, J.T., YUSUF, R., SANGAT-ROEMANTYO, H.,
SOEDJITO, ANGERHOFER, C.K., PEZZUTO, J.M. Malaria remedies of the
Kenyah of the Apo Kayan, east Kalimantan, Indonesian borneo: a quantitative
assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. *J.*
Ethnopharmacol., Lausanne, v.49, p.1- 16, 1995.

LEE-HUANG, S., HUANG, P.L., NARA, P.L., CHEN, H., KUNG, H., HUANG, P.,
HUANG, H.I., HUANG, P.L. MAP 30 : a new inhibitor of HIV -1 infection and
replication. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.272, n.1,2, p.12 - 18, 1990.

LIMA, E. O. **Estudo das dermatofitoses em João Pessoa - Paraíba e da
atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns
dos agentes isolados.** São Paulo, 1996. 180p. [Tese de Doutorado -
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

LIMA, L.M. **Sensibilidade *in vitro* de *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 a agentes antiamebianos.** São Paulo, 1991. 62p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. **I farmaci di origine vegetale - tecnologie di estrazione dalle piante medicinali.** Milano: Hoepli, 1989. 421p.

LOSSICK, J.G. Treatment of sexually transmitted/ vaginitis. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.12, suppl. 6, p. 665 - 681, 1990.

LOSSICK, J.G., MULLER, M., GORREL, T.E. *In vitro* drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.153, p. 948 - 955, 1986.

LUCCHETTI, L., SILVA, A.J.R. Caracterização de novos poliacetilenos presentes na fração ativa de *Bidens pilosa* L. (*Asteraceae*) contra hepatite B. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., Florianópolis, 1996. **Resumos:** Florianópolis, 1996. p. 187.

MAGALHÃES, P.M. A experimentação agrícola com plantas medicinais e aromáticas. *Atual. Científicas*, n. 3, p. 31 - 56, 1993.

MAGALHÃES, P.M. **Seleção, melhoramento e nutrição da *Artemisia annua* L., para cultivo em região intertropical.** Campinas, 1996. 116p. [Tese de Doutorado - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas].

MAKIOKA, A., ELLIS, J. DNA polymerases of parasitic protozoa. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v. 24, n. 4, p. 463 - 473, 1994.

MALONE, M.H. The pharmacological evaluation of natural products - general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.8, p. 127 - 147, 1983.

MEINGASSNER, J.G., THURNER, J. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5 - nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 15, n. 2, p. 254 - 257, 1979.

MICHE, M.P. **Prova de Sensibilidade *in vitro* de *Trichomonas vaginalis* a medicamentos pela técnica de difusão com discos.** São Paulo, 1978. 129p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

- MINKOFF, H., GRUNEBAUM, A.M., SCHWARZ, R.H., FELDMAN, J., CUMMINGS, M., CROMBLEHOLME, W., CLARK, L., PRINGLE, G., McCORMACK, W. Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: A prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, St. Louis, v. 15, p. 965 - 972, 1984.
- MITSCHER, L.A., DRAKE, S., GOLLAPUDI, S.R., OKWUTE, S.K. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.*, Cincinnati, v.50, n. 6, p. 1025 - 1040, 1987.
- N'DOUNGA, M., BALANSARD, G., BABADJAMIAN, A., DAVID, P.T., GASQUET, M., BOUDON, G. Contribution a l'etude de *Bidens pilosa* L. Identification et activité antiparasitaire de la phénil -1 heptatriyne -1,3,5. *Plant. Med. Phytothér.*, Angers, v. 17, n. 2, p. 64 -75, 1983.
- OGUNLANA, E.O., RAMSTAD, E. Investigations into the antibacterial activities of local plants. *Planta Med.*, Stuttgart, v.27, p.354 - 360, 1975.
- PEI - GEN, X., SHAN -LIN, F., Traditional antiparasitic drugs in China. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 2, n. 12, p. 353 - 355, 1986.
-

PEREIRA, C.M.P., PERAZZOLO, M., SUSIN, V.L.N., BERSGESCH, M.

Levantamento preliminar dos vegetais medicamentosos existentes no município do Rio Grande do Sul, (RS). *Acta Amazônica*, Manaus, v.18, suppl. 1-2, p.49 - 59, 1988.

PESSOA, S.M., MARTINS, A.M. **Parasitologia médica**. 10. ed., Rio de

Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 986p.

PHILLIPSON, J.D., O'NEILL, M.J. New leads to the treatment of protozoal

infections based on natural product molecules. *Acta Pharm. Nord.*, Stockholm, v. 1, n.3, p.131 - 143, 1989.

PHILLIPSON, J.D., WRIGHT, C.W. Antiprotozoal agents from plant sources.

Planta Med., Stuttgart, v. 57, suppl. 1, p.53 - 59, 1991a.

PHILLIPSON, J.D., WRIGHT, C.W. Can ethnopharmacology contribute to the

development of antimalarial agents ? *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.32, p. 155 - 165, 1991b.

PHILLIPSON, J.D., WRIGHT, C.W. Medicinal plants in tropical medicine. *Trans.*

R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v. 85, p. 18 - 21, 1991c.

PHILLIPSON, J.D. Natural products as drugs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*,

London, v.88, suppl. 1, p.17 -19, 1994.

PILLAY, D.G., HOOSEN, A.A., VEZI, B., MOODLEY, C. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in male urethritis. *Trop. Geogr. Med.*, Amsterdam, v.46, n.1, p. 44 - 45, 1994.

PIRES, M.J.P., GRIPP, A. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em banco ativo de germoplasma. *Acta Amazônica*, Manaus suppl.1-2, v. 18, p. 61 - 73, 1988.

PIVA, S. **Espermograma análises e técnicas**. 7ed. São Paulo: Livraria Santos, 1988. 123p.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS - Secretaria Municipal de Cultura, Esportes e Turismo, Departamento de Turismo, 1988. Apud: VITURI, C.L. **Valores eritrocitários e concentração sérica de ferro e ferritina em escolares em zona periférica da cidade de Campinas estado de São paulo**. São Paulo, 1991. 77p [Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

POLUNIN, M., ROBBINS, C. **A farmácia natural**. s.l.p.: Livraria Civilização, 1993. 143p.

PRISTA, N.L., ALVES, C.A., MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste, 1981. v.1.

- QUON, D.V.K., D'OLIVEIRA C.E., JOHNSON, P.J. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole - resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 89, p.4402 - 4406, 1992.
- RÊGO, T.J.A.S. Levantamento de plantas medicinais da baixada Maranhense. *Acta Amazônica*, Manaus, v.18, suppl 1-2, p. 75 - 88, 1988.
- REY, L. *Parasitologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.731p.
- ROSENBERG, M.J., DAVIDSON, A.J., CHEN, J.H., JUDSON, F.N., DOUGLAS, J.M. Barrier contraceptives and sexually transmitted diseases in women: a comparison of female - dependent methods and condoms. *Am. J. Public Health*, Washington, v. 82, n.5, p.669 -674, 1992.
- SAHPAZ, S., BORIES, C., LOISEAU, P.M., CORTÈS,D., HOCQUEMILLER, R., CAVÈ,A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Med.*, Stuttgart, v.60, p. 538 -540, 1994.
- SAMUELSSON, G. Nature as a source of new drugs. *Acta Pharm. Nord.*, Stockholm, v.1, n.3, p.111 - 116, 1989.
- SANTOS, M.A.C., KLEIN, A., ELIZABETSKY, E. Aplicação da metodologia etnofarmacológica na procura por compostos anticancerígenos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., Florianópolis, 1996. **Resumos:** Florianópolis, 1996, p.63.
-

- SARDANA, S., SODHANI, P., AGARWAL, S.S., ROY, M., SINGH, V., BHATNAGAR, P., MURTHY, N.S. Epidemiologic analysis of *Trichomonas vaginalis* infection in inflammatory smears. *Acta Citol.*, Baltimore, v. 38, n. 5, p.693 - 697, 1994.
- SCHMID, G.P., MATHENY, L.C., ZAIDI, A.A., KRAUS, S.J. Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.27, n.6. p.1230 - 1233, 1989.
- SHARAPIN, N. Controle de qualidade de plantas medicinais e produtos fitoterápicos. In: REUNIÓN ANUAL DE LA RED IBEROAMERICANA DE PRODUCTOS NATURALES DE USO MEDICINAL, 3., Guatemala, **Informes**. [Guatemala], [RIPRONAMED], 1993. p.83 -87.
- SHARMA, P., MALLA, N., GUPTA, I., GANGULY, N.K., MAHAJAN, R.C. A comparison of wet mount, culture and enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of trichomoniasis in women. *Trop. Geogr. Med.*, Amsterdam v.43, p. 257 - 260, 1991.
- SINGH, B.N. The existence of lipophosphoglicans like molecules in Trichomonads *Parasitol. Today*, Amsterdam, v.10, n.4, p.152 - 154, 1994.
-

SINGH, S.P., NEGI,S., CHAND,L., SINGH,A.K. Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. *Fitoterapia*, Milano, v.58, n.1, p.76 - 77, 1992.

SPENCER, C.F., KONIUSZY, F.R., ROGERS,E.F., SHAVEL,J. JR., EASTON, N. R., KACZKA, E.A., KUEHL, F.A. JR., PHILLIPS, R.F., WALTI, A., FOLKERS, K. Survey of plants for antimalarial activity. *Lloydia*, Cincinnati, v.10, n.3, p. 145 - 175, 1947.

TAYLOR, A.E.R., BAKER, J.R. **The cultivation of parasites *in vitro***. Oxford: Blackwell, 1968. 377p.

THOMASON, J.L., GELBART, S.M., SOBUN, J.F., SCHULIEN, M.B., HAMILTON, P.R. Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.26, n.9, p.1869 - 1870, 1988.

TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F.L., UPCROFT, P.; UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop.*, Basel, v.56, p. 173 - 194, 1994.

TYLER, V.E. Medicinal plant research: 1953 - 1987. *Planta Med.*, Stuttgart, v.54, p.95 - 100, 1988.

VON HERTIG, I.F. **Plantas aromáticas e medicinais**. São Paulo: Ícone, 1986. 449p.

WALLER, D.P. Methods in ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.38, p.189 - 195, 1993.

WANG, H.H. Antitrichomonal action of emodin in mice. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.40, p.111 - 116, 1993.

WEINBERGER, M.W., HARGER, J.H. Accuracy of the Papanicolau smear in the diagnosis of asymptomatic infection with *Trichomonas vaginalis*. *Obstet. Gynecol.*, St. Louis, v.82, n.3, p. 425 - 429, 1993.

WHITE, N.J. Artesininin: current status. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.88, suppl. 1, p.3 - 4, 1994.

WILLIAMS, D.H., STONE, M.J., HAUCK, P.R., RAHAMAN, S.K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.*, Cincinnati, v.52, n.6, p.1189 - 1208, 1989.

WILLIAMSON, E.M., OKPAKO, D.T., EVANS, F.J. **Pharmacological methods in phytotherapy research.** New York : Willey ,1996. v.1, 228p.

WRIGHT, C.V., O'NEILL M.J., PHILLIPSON, J.D., WARHURST, D.C. Use of microdilution to assess *in vitro* antiamebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem and a number of quassinoids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.32, n.11, p. 1725 - 1729, 1988.

WRIGHT, C.W., PHILLIPSON, J.D. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother. Res.*, London, v.4, n.4, p.127 -139, 1990.

WU, J., ZHANG, M., DING, D., TAN, T., YAN, B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis in vitro*. *Chung Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih*, v.13, n.2, p. 126- 129, 1995. Apud: **Comprehensive medline Peabody: EBSCO, 1996 ,UI: 96041138.**