

DANDARA BRAGA SANTANA

**Atividade leishmanicida e antifúngica de extratos de plantas do Cerrado
e isolamento do pterocarpano vatacarpina em *Vatairea macrocarpa***

Brasília, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANDARA BRAGA SANTANA

**Atividade leishmanicida e antifúngica de extratos de plantas do Cerrado
e isolamento do pterocarpano vatacarpina em *Vatairea macrocarpa***

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola

Aprovada em 5 de julho de 2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois tu és minha força e meu refúgio nesses 8 anos em Brasília.

À Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola, pela oportunidade de crescimento a mim oferecida, pelos ensinamentos desde a graduação e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. José Elias/UnB, pela participação fundamental nas coletas, identificação botânica das espécies vegetais do Cerrado e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva/UFG, pela colaboração com o fornecimento dos isolados clínicos de leveduras e dermatófitos para a realização dos testes de susceptibilidade antifúngica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Romero/UnB, pela parceria ao permitir que utilizássemos o laboratório da medicina tropical para os testes em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho/UFRRJ, Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira/UFC e Prof^a. Dr^a. Renata Mendonça Araújo/UFRN, pelo auxílio na caracterização das estruturas moleculares dos compostos isolados.

À Prof^a. Dr^a. Mariana Laundry Mesquita/UnB, Prof^a. Dr^a. Lorena Carneiro Albernaz/UnB e Prof^a. Dr^a. Sílvia Ribeiro de Souza/UnB, pelos ensinamentos, sugestões, conselhos e conversas reconfortantes.

À equipe do Laboratório de Farmacognosia, graduandos, pós-graduandos, técnicos e secretários pela colaboração valiosa em minha dissertação, pelos ensinamentos e pelas confraternizações.

À minha irmã em Brasília Raphaella Correia da Costa e sua família (incluindo seus cães Nick e Dália), obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, pelas conversas, pela confiança, pelos conselhos, pelo apoio, por me motivar sempre, pela parceria nos inúmeros experimentos (em qualquer

hora, dia da semana e lugar), pela companhia nos estudos, no trabalho... Essa dissertação também é sua!

Aos meus amigos de Brasília, que tornam minha estadia aqui algo prazeroso e à **minha amiga em Goiânia Thais Kato**, que sempre me recebe de braços abertos, mesmo depois de tantos anos ausentes.

Aos meus colegas de trabalho da Assessoria de Insumos Estratégicos para Saúde Indígena/SESAI/MS e da Farmácia Ambulatorial Especializada/SES/DF, por compreenderem e permitirem minhas ausências para cursar as matérias da pós, participar de congressos, fazer experimentos e participar de reuniões.

Aos meus tios Titida e Januário, meus anjos em Brasília, pelo apoio durante todos esses anos através de conversas, socorros e abrigo quando adoecia, conselhos, caronas para Goiânia...

Aos meus pais e irmãos, por serem meus guias, minha base. Pai e mãe, meus exemplos de garra e determinação. Irmãos, amo vocês. Desculpem as ausências. Vocês tornaram este sonho possível. Obrigada!

À CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa durante parte deste percurso e suporte financeiro.

*“As pessoas mais felizes (...) sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.”*

(Clarice Lispector)

RESUMO

Tanto as infecções fúngicas quanto as leishmanioses são caracterizadas por tratamentos tóxicos, resistência crescente aos medicamentos disponíveis e manejo clínico com fármacos similares, como a anfotericina B. Diante desse cenário, descobrir novas alternativas terapêuticas para esses modelos biológicos torna-se uma ferramenta interessante para a comunidade acadêmica e necessária para a prática clínica. Os metabólitos secundários de plantas são uma fonte importante de moléculas promissoras para diversas doenças. Neste trabalho foi realizada uma triagem de extratos pertencentes a três espécies de plantas do Cerrado em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, dermatófitos e leveduras: *Enterolobium ellipticum* Benth. (Fabaceae), *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill. (Fabaceae) e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Fabaceae). O extrato de *Vatairea macrocarpa* apresentou os melhores resultados nos microorganismos testados, sendo que essa atividade ainda não havia sido relatada na literatura. O extrato acetato de etila da casca da raiz foi selecionado para o fracionamento químico e foram isolados e identificados os compostos **dianellidina (D3)** e **vatacarpina (D93)**, sendo esta última não descrita na literatura.

Palavras-chave: *Enterolobium ellipticum*, *Sclerolobium aureum*, *Vatairea macrocarpa*, Cerrado, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, fungos

ABSTRACT

Leishmaniasis as well fungal infections are diseases which have toxic and similar treatments (i.e., amphotericin B) and increasing resistance to available drugs. So, finding out new therapeutic alternatives for these biologic models is essential to research and clinical practices. Plant secondary metabolites are an interesting avenue to find out promising molecules to several diseases. This work conducted a screening of Cerrado species extracts *Enterolobium ellipticum* Benth. (Fabaceae), *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill. (Fabaceae) e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Fabaceae) against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, dermatophytes and yeasts. *Vatairea macrocarpa* extracts presented the most promising results against all three microorganisms, which has not been described in the literature. The ethyl acetate extract of the root bark was selected for chemical fractionation and the following compounds were identified: ethanone (**D3**) and **vatacarpina (D93)**, that hasn't been previously reported.

Keywords: *Enterolobium ellipticum*, *Sclerolobium aureum*, *Vatairea macrocarpa*, Cerrado, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, fungos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da citosina, 5-fluorocitosina e 5-fluorouracil.....	20
Figura 2. Estrutura química da anfotericina B, nistatina e natamicina.....	21
Figura 3. Estruturas químicas dos principais azóis.....	23
Figura 4. Estrutura química da micafungina e caspofungina.....	25
Figura 5. Alvos celulares dos antifúngicos.....	26
Figura 6. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar.....	29
Figura 7. Espectro clínico da LTA.....	30
Figura 8. Forma flagelada ou promastigota de <i>Leishmania</i>	32
Figura 9. Forma aflagelada ou amastigota de <i>Leishmania</i>	32
Figura 10. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.....	33
Figura 11. Ciclo de transmissão de leishmaniose.....	34
Figura 12. Lesões ulcerosas no braço e cicatrizes atróficas seis meses após o tratamento.....	35
Figura 13. Antimoniais pentavalentes.....	36
Figura 14. Anfotericina B.....	37
Figura 15. Pentamidina.....	37
Figura 16. Biomas brasileiros.....	39
Figura 17. <i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	41
Figura 18. <i>Sclerolobium aureum</i> (Tul.) Baill.	43
Figura 19. <i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke.	45
Figura 20. Etapas de produção dos extratos brutos.....	49
Figura 21. Resultados obtidos com 130 testes (em triplicata) realizados para os 26 extratos em leveduras e dermatófitos.....	62
Figura 22. Porcentagem de extratos brutos ativos nos fungos testados.....	65

Figura 23. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>Vmacrocarpa</i>	70
Figura 24. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de subgrupos oriundos do Grupo 5 do fracionamento inicial do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>V. macrocarpa</i>	73
Figura 25. Estrutura molecular da dianellidina (D3).....	76
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H de D3	77
Figura 27. Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY de D3	78
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C de D3	79
Figura 29. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC de D3	80
Figura 30. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HMBC de D3	81
Figura 31. Espectro de absorção na região do infravermelho de D3	83
Figura 32. Proposta para a estrutura química de D5	84
Figura 33. Espectro de RMN ¹³ C de D5	85
Figura 34. Estrutura química da vatacarpina (D93).....	86
Figura 35. Espectro de absorção na região do infravermelho de D93	89
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H de D93	90
Figura 37. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY de D93	91
Figura 38. Espectro de RMN ¹³ C-CPD de D93	92
Figura 39. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC de D93	93

Figura 40. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de D93	94
Figura 41. Espectro de massa de baixa resolução de D93	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das principais infecções fúngicas mundiais.....	18
Tabela 2. Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de doenças humanas no Novo Mundo.....	31
Tabela 3. Avaliação do teste para triagem dos extratos à 100 µg/mL.....	53
Tabela 4. Extratos brutos produzidos neste estudo.....	60
Tabela 5. Avaliação da atividade antifúngica e antileishmania dos extratos brutos.....	67
Tabela 6. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>V. Macrocarpa</i>	69
Tabela 7. Fracionamento do Grupo 2 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>V. Macrocarpa</i>	71
Tabela 8. Fracionamento do Grupo 5 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>V. Macrocarpa</i>	72
Tabela 9. Fracionamento dos subgrupos 9 e 10 reunidos (provenientes do grupo 5 de <i>V. macrocarpa</i>).....	73
Tabela 10. Fracionamento do Grupo 7 do extrato acetato de etila da casca da raiz de <i>V. Macrocarpa</i>	74
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de D-3 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	82
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de D-93 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.....	95

LISTA DE ABREVIações

μL - microlitro

μg – micrograma

ae – acetato de etila

CC – casca do caule

CR – casca da raiz

$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ – piridina

CCD – Cromatografia em camada delgada

CD_3OD – metanol deuterado

CDCl_3 – clorofórmio deuterado

CO_2 - ácido carbônico

COSY - espectroscopia de correlação (*correlated spectroscopy*)

d – dubleto

DMSO – Dimetilsulfóxido

e – etanol

EM-IE - Espectros de massa de Baixa Resolução

F – folha

g – grama

h – hexano

h – hora

H_2O - água

HMBC - *heteronuclear multiple bond coherence*

HSQC - *heteronuclear single-quantum coherence*

Hz - hertz

CI_{50} – Concentração inibitória de 50% do efeito leishmanicida

J – constante de acoplamento

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

m – multiplete

MC – madeira do caule

m/z – relação massa/carga

MeOH - Metanol

mg - miligrama

MHz - megahertz

min - minuto

mL - mililitro

mm – milímetro

Mo - 2-hydroxy-4,9-dimethoxypterocarpin (pterocarpano isolado na literatura)

MR – madeira da raiz

MS – Ministério da Saúde

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

nm - nanômetro

°C - celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – solução tampão fosfato

ppm – parte por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN 13C-CPD - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 –
Desacoplamento com Pulso Composto

RMN ¹³C DEPT 135° - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 –
Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm – rotação por minuto

s - singleto

Sb³⁺ - antimônio trivalente

Sb⁵⁺ - antimônio pentavalente

SFB - soro fetal bovino inativado

t - tripleto

UnB – Universidade de Brasília

UV - Ultravioleta

δ – deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Cenário das infecções fúngicas	17
1.1.1 Tratamento	19
1.1.1.1 Fluoropirimidinas	19
1.1.1.2 Polienos	21
1.1.1.3 Azóis	22
1.1.1.4 Equinocandinas	24
1.1.2 Incidência e mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos	27
1.2 Cenário das leishmanioses	28
1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	29
1.2.1.1 Agente etiológico	30
1.2.1.2 Vetor	32
1.2.1.3 Hospedeiros e reservatórios	33
1.2.1.4 Ciclo de transmissão	33
1.2.1.5 Tratamento	34
1.2.1.5.1 Antimoniato de meglumina	35
1.2.1.5.2 Anfotericina B	36
1.2.1.5.3 Pentamidinas	37
1.2.1.5.4 Outros tratamentos não padronizados no Brasil pelo Ministério da Saúde	38
1.3. Cerrado	39
1.3.1 <i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	41
1.3.2 <i>Sclerolobium aureum</i> (Tul.) Baill.	43
1.3.3 <i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke.	45
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo Geral	47

2.2 Objetivos Específicos.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Obtenção dos extratos brutos	48
3.2 Testes Biológicos	49
3.2.1 Método de avaliação da atividade antifúngica	49
3.2.1.1 Preparo das amostras e dos controles.....	50
3.2.1.2 Preparo do meio RPMI 1640 para o teste de microdiluição	50
3.2.1.3 Inóculo de leveduras	50
3.2.1.4 Inóculo de fungos filamentosos.....	51
3.2.1.5 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	51
3.2.2 Método de avaliação da atividade antileishmania	52
3.2.2.1 Preparo das amostras e do controle positivo	52
3.2.2.2 Preparo do meio de cultura	52
3.2.2.3 Cultura de formas promastigotas	52
3.2.2.4 Triagem da atividade de extratos brutos de plantas.....	53
3.2.2.5 Triagem dos extratos brutos.....	53
3.2.2.6 Determinação de CI_{50}	54
3.2.2.7 Avaliação dos resultados	54
3.3 Purificação e identificação das substâncias isoladas.....	55
3.3.1 Métodos cromatográficos	55
3.3.1.1 Coluna líquida a pressão atmosférica	55
3.3.1.2 Cromatografia em camada delgada	55
3.3.2 Métodos Espectrométricos	56
3.3.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	56
3.3.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C).....	56
3.3.2.3 Espectrometria de massa.....	58

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Avaliação biológica dos extratos brutos	59
4.2 Fracionamento químico.....	69
4.3 Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos de <i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke.	75
4.3.1 Determinação Estrutural de D3	75
4.3.2 Determinação Estrutural de D5	84
4.3.3 Determinação Estrutural de D93	86
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
6 PERSPECTIVAS.....	99
7 REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cenário das infecções fúngicas

No início do século XX, as infecções fúngicas pouco se revelavam como uma ameaça à saúde pública mundial enquanto as epidemias bacterianas eram uma das principais causas de mortalidade no mundo. Porém, desde o fim da década de 60, tem-se observado o aumento na incidência de infecções fúngicas devido ao crescente número de casos de indivíduos imunocomprometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), com câncer, idade avançada, diabetes, fibrose cística e transplante de órgãos (NEOFYTOS *et al.*, 2013; MUBARAKA *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2013; PERSON *et al.*, 2011).

As infecções fúngicas são causadas por dois tipos de micro-organismos: patógenos primários e oportunistas. Os patógenos primários são aqueles capazes de estabelecer uma infecção em indivíduos saudáveis. Já os oportunistas são capazes de estabelecer uma infecção no corpo humano devido a uma supressão do sistema imunológico, podendo acontecer mesmo com os micro-organismos comensais de indivíduos saudáveis (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Os fungos patogênicos podem ser ainda divididos em dois grandes grupos: filamentosos e leveduras. A maioria dos patógenos primários são fungos filamentosos, enquanto que a maioria dos oportunistas são leveduras (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

As infecções fúngicas também podem ser classificadas de acordo com a localização no corpo humano (Tabela 1). As superficiais estão confinadas a camadas mais externas da pele e cabelo e são conhecidas como tínea versicolor. As cutâneas afetam estruturas queratinizadas do corpo, geralmente causadas por dermatófitos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A maioria dos casos requer uma alteração do sistema imune para que a infecção possa se estabelecer (MINNEBRUGGEN *et al.*, 2010). As infecções da mucosa são causadas principalmente por leveduras

oportunistas, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Candida*. *Candida albicans* está implicada em aproximadamente 50% dos pacientes com candidíase; no entanto, infecções causadas por outras espécies, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanae*, têm aumentado. Candidíase do trato urinário, orofaríngea, esofágica e vaginal são as mais frequentes em pacientes imunocomprometidos (KLEPSER, 2011). E as micoses sistêmicas podem atingir qualquer parte do organismo humano sendo que espécies consideradas não-patogênicas, como os micro-organismos comensais, podem se tornar patógenos oportunistas responsáveis por micoses sítio-profundas. Essas infecções sistêmicas com sintomas variando entre febre a um choque séptico rápido e severo são mais comuns em pacientes imunocomprometidos e associam-se a uma elevada taxa de mortalidade. Os patógenos mais frequentemente envolvidos são dos gêneros: *Candida*, *Pneumocystis*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Coccidioidomyces* (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Tabela 1. Características das principais infecções fúngicas mundiais

Localização corporal	Patógeno	Órgão	Gêneros mais frequentes
Superficial	Primário	Pele e cabelo	<i>Malassezia</i>
Cutânea	Primário	Pele e unhas	<i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i>
Mucosa	Oportunista	Vagina, trato digestivo, trato urinário e olhos	<i>Candida</i>
Sistêmico	Oportunista	Outros órgãos (pulmão, cérebro, sangue)	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida</i> e outros

Fonte: Adaptado de VANDEPUTTE *et al.*, 2012.

1.1.1 Tratamento

São quatro estratégias para o tratamento de infecções fúngicas: profilática, empírica, preventiva e direcionada. O tratamento profilático é geralmente iniciado em pacientes com alto risco para infecções fúngicas, como pacientes transplantados e imunocomprometidos. Já o empírico é iniciado após o surgimento de sintomas não específicos, antes da confirmação laboratorial por cultura positiva ou outro ensaio diagnóstico. A terapia preventiva é iniciada antes de alguns sinais/sintomas de uma infecção fúngica em pacientes com um alto índice de suspeita determinado por mais de uma técnica diagnóstica, como testes de anticorpo sérico e tomografia computadorizada de alta resolução. E quando o agente fúngico é identificado (gênero e/ou espécie), tem-se a terapia direcionada (KLEPSEK, 2011).

Apesar das pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, apenas um número limitado de medicamentos estão disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas. Somente quatro classes de fármacos que interferem em três vias metabólicas dos fungos são usadas na prática clínica: análogos de fluoropirimidinas, polienos, azóis e equinocandinas (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

1.1.1.1 Fluoropirimidinas

Fluoropirimidinas, dos quais apenas o 5-fluorocitosina (5-FC) e o 5-fluorouracil (5-FU) são usados na medicina humana, são análogos estruturais sintéticos da citosina, uma base nitrogenada do DNA (TASSEL & MADOFF, 1968) (Figura 1).

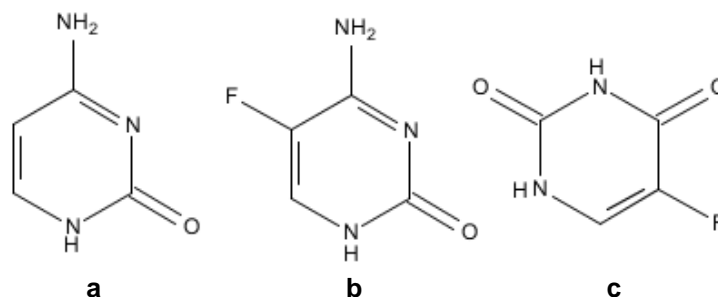


Figura 1. Estrutura química da citosina (a), 5-fluorocitosina (5-FC) (b) e 5-fluorouracil (5-FU) (c). Fonte: VANDEPUTTE *et al.*, 2012.

O análogo 5-FC foi inicialmente utilizado na clínica na terapia contra o câncer. Anos depois, esse análogo foi usado com sucesso no tratamento de candidíase sistêmica e meningite criptocócica. Mostrou-se ainda ativo em protozoários do gênero *Leishmania* e *Acanthamoeba* (POUND *et al.*, 2011).

Devido à alta hidrossolubilidade e ao pequeno tamanho, a molécula 5-FC possui propriedades farmacocinéticas interessantes, como a difusão rápida pelos tecidos corporais quando administrada oralmente. Os efeitos adversos mais comuns são gastrointestinais (6%) e podem incluir náusea, vômito, diarreia e desconforto abdominal. Hepatotoxicidade tem sido reportada com elevação de transaminases e fosfatase alcalina. Supressão da medula óssea, manifestada por leucopenia ou trombocitopenia, pode ocorrer também, com um estudo demonstrando uma incidência de 27% (POUND *et al.*, 2011).

Devido à ocorrência frequente de resistência adquirida ou inata em fungos patogênicos tratados com esse análogo, o uso na prática clínica está em declínio. O 5-FC geralmente não é usado como monoterapia. Quando associado à anfotericina B, essa combinação torna-se fungicida para a maioria das espécies e requer baixas doses de ambos agentes (POUND *et al.*, 2011).

Quando empregado como monoterapia, o análogo 5-FC tem ação fungistática, que é dependente de sua conversão em 5-FU pelas células fúngicas. A molécula 5-FC entra na célula por transportadores específicos, como citosinas permeases ou transportadores de pirimidinas e, então, converte-se em 5-FU pela citosina deaminase. 5-FU é convertida então a 5-fluorouracil monofosfatase (5-FUMP) pela enzima uridina fosforibosiltransferase

(UPRT). 5-FUMP pode, então, seguir duas vias metabólicas: converter-se a 5-fluorouracil trifosfato (5-FUTP), que é incorporado ao RNA da célula do fungo no lugar de UTP, inibindo a síntese de proteínas; ou converter-se a 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP), que inibe a timidilato sintase, uma importante enzima na síntese de DNA. Embora as células no organismo humano possam metabolizar esse composto, os efeitos são minimizados pela ausência da enzima citosina deaminase (WALDORFF & POLAK *et al.*, 1983).

1.1.1.2 Polienos

Mais de 200 moléculas pertencentes à classe química dos polienos têm atividade antifúngica, porém, devido à alta toxicidade, apenas três são possíveis de serem utilizados na prática clínica: anfotericina B, nistatina e natamicina (VANDEPUTTE *et al.*, 2012) (Figura 2).

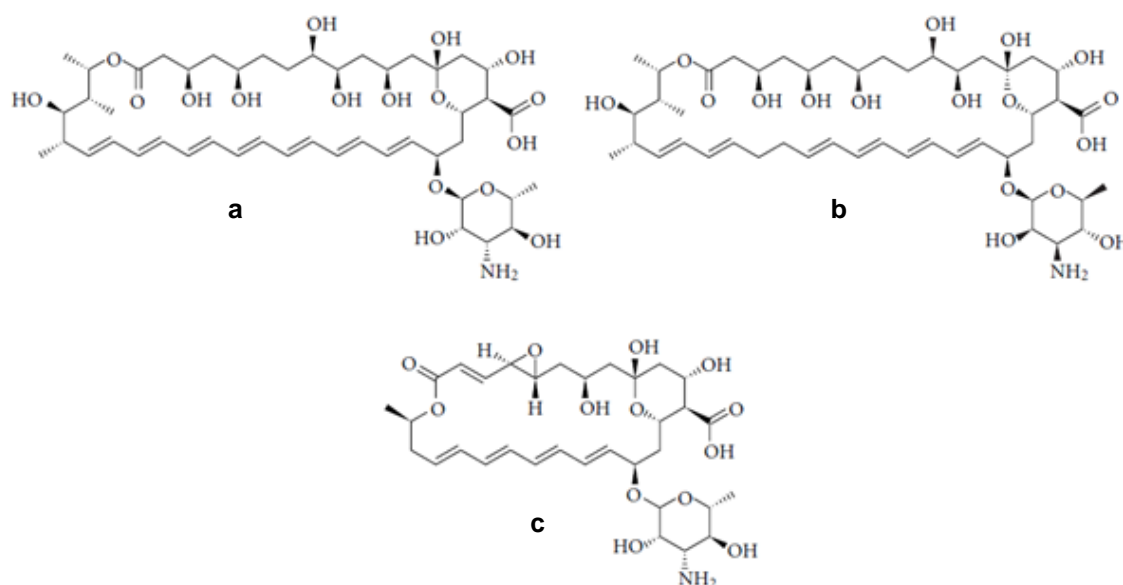


Figura 2. Estrutura química da anfotericina B (a), nistatina (b) e natamicina (c). Fonte: VANDEPUTTE *et al.*, 2012.

O alvo dessa classe é o ergosterol, o principal esteroide das membranas fúngicas. O caráter anfílico dos polienos permite que eles se liguem ao ergosterol na membrana dos fungos e formem poros. Estes poros promovem desestabilização da membrana plasmática permitindo que componentes intracelulares, como íons K⁺, saem, provocando lise celular. São, portanto, fungicidas (LEMKE *et al.*, 2005).

Polienos possuem uma baixa afinidade pelo colesterol, o correspondente do ergosterol em humanos. Essa pequena afinidade, no entanto, explica a alta toxicidade associada a esses antifúngicos e é responsável por vários efeitos adversos (LEMKE *et al.*, 2005).

A anfotericina B é o antifúngico da classe dos polienos mais utilizado para infecções sistêmicas. Por apresentar alta hidrofobicidade e baixa absorção gastrointestinal, esse fármaco é administrado por via endovenosa. O tratamento com a formulação convencional da anfotericina B apresenta alta incidência de nefrotoxicidade, além de reações devido à infusão (febre, dor de cabeça, náusea, anorexia, hipotensão e taquipneia), limitando seu uso e geralmente requerendo redução da dose. No entanto, as novas formulações desse fármaco, como anfotericina B lipossomal, minimizam esses efeitos (KLEPSER, 2011; SAFDAR *et al.*, 2010).

Por mais de 40 anos, anfotericina B foi um dos padrões ouro para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas devido à baixa ocorrência de resistência inata ou adquirida e ao amplo espectro de ação. De fato esse fármaco é ativo contra a maioria das leveduras e fungos filamentosos, sendo indicado para o tratamento de infecções causadas por *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scedosporium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, entre outros. É ainda amplamente usado para o tratamento de infecções parasitárias como leishmanioses e amebíases (LEMKE *et al.*, 2005).

1.1.1.3 Azóis

Os azóis são os compostos antifúngicos mais utilizados na clínica e, conseqüentemente, os mais estudados pela comunidade científica que busca propor mecanismos de ação, definição de propriedades farmacológicas e soluções para os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos micro-organismos (KLEPSER, 2011).

Essas moléculas orgânicas cíclicas podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico: imidazólicos,

contendo dois átomos de nitrogênio; e triazólicos, contendo três átomos de nitrogênio (MAERTENS, 2004) (Figura 3).

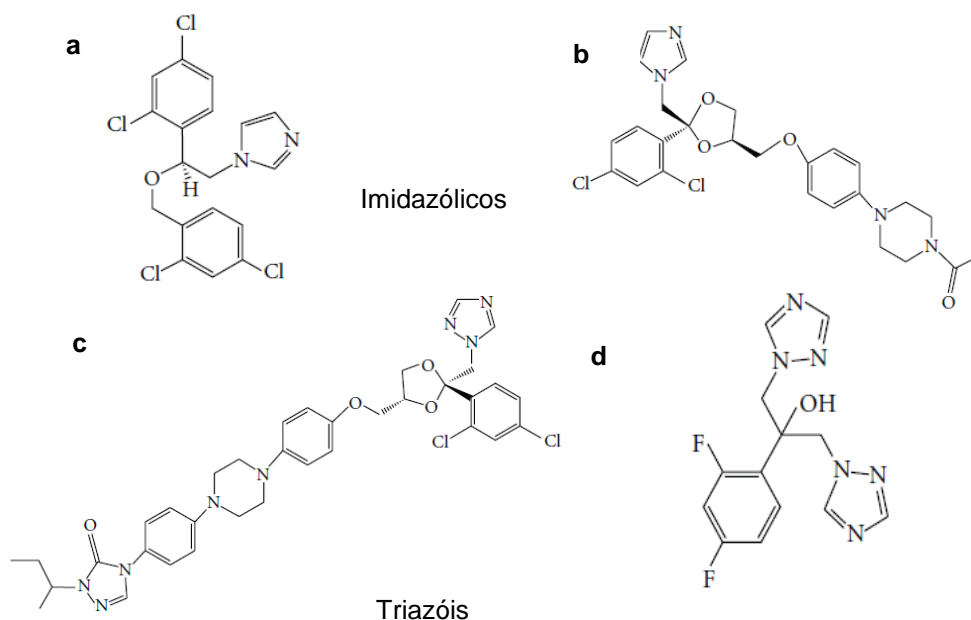


Figura 3. Estruturas químicas dos principais azóis: miconazol (a), cetoconazol (b), itraconazol (c) e fluconazol (d). Fonte: VANDEPUTTE *et al.*, 2012.

Os triazóis inibem a síntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14 α -dimetilase dependente de CYP-450. A inibição dessa enzima promove a acumulação de metilesteróis resultando em morte celular fúngica. Os efeitos adversos e interações medicamentosas são devido à inibição cruzada das enzimas CYP-450 em humanos (POUND *et al.*, 2011).

O fluconazol tornou-se disponível para uso clínico em 1990 trazendo vantagens em relação ao uso de imidazóis. Esse fármaco é altamente hidrossolúvel e pode ser facilmente administrado por via endovenosa. Além disso, é quase completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, difundindo-se por todo o corpo, incluindo o fluido cérebro espinhal (BRAMMER *et al.*, 1990). Está disponível para o tratamento de candidíases superficiais (orofaríngea, esofágica e vaginal), candidíase disseminada, meningite criptocócica, coccidioidomicose e candidíase cutânea. Devido às boas propriedades farmacocinéticas e ao amplo espectro de ação, o fluconazol foi considerado o padrão ouro para o tratamento de infecções fúngicas durante a

década de 90. No entanto, a prescrição excessiva deste medicamento pelos profissionais da saúde para profilaxia ou tratamento conduziu ao aumento da resistência dos fungos aos azóis (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

O itraconazol, também representante da classe dos triazóis, possui um amplo espectro de ação sobre os fungos, superior ao fluconazol. É usado na clínica para o tratamento de histoplasmose, blastomicose e paracoccidioidomicose. Com relação aos parâmetros farmacocinéticos, é hidrofóbico e mais tóxico que o fluconazol (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Uma nova geração dos triazóis tem sido desenvolvida, como o voriconazol e pasoconazol (IANAS *et al.*, 2010). Apesar de demonstrarem mais efetivos em *Candida* e *Aspergillus*, possuem efeitos adversos e interações medicamentosas similares àqueles observados com os triazóis clássicos. Além disso, isolados de fungos resistentes ao itraconazol e fluconazol são também resistentes a essa nova geração de triazóis (POTOSKI & BROWN, 2002).

Os principais efeitos adversos dessa classe são: náusea, vômito, diarreia e hepatotoxicidade. Por inibir as enzimas do citocromo P450, os triazóis tem o potencial de interagir com outras classes de medicamentos, como antiretrovirais, anticonvulsivantes, agentes quimioterápicos, inibidores da HMG-CoA redutase, imunossupressores e amiodarona (POUND *et al.*, 2011).

1.1.1.4 Equinocandinas

As equinocandinas, como a caspofungina e a micafungina, representam uma nova classe terapêutica de medicamentos antifúngicos. São derivados sintéticos de lipopolipeptídeos produzidos naturalmente por várias espécies de fungos (VANDEPUTTE *et al.*, 2012) (Figura 4).

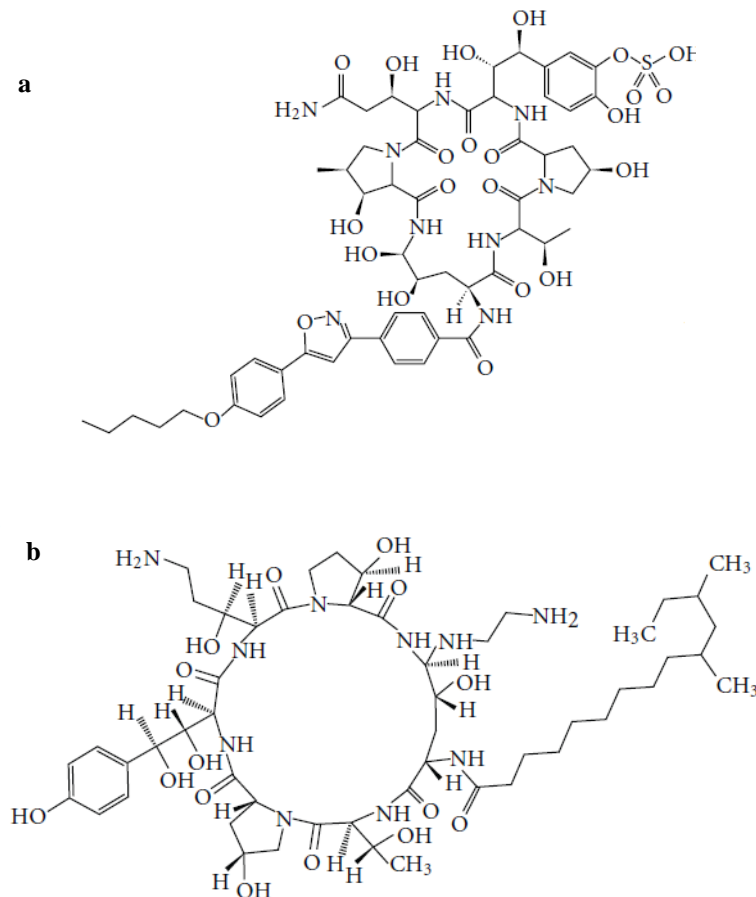


Figura 4. Estrutura química de equinocandinas: micafungina (a) e caspofungina (b). Fonte: VANDEPUTTE *et al.*, 2012.

O que torna essa classe única é o alvo de ação: a parede celular. Essa estrutura não possui equivalente na espécie humana, o que torna o fármaco menos tóxico. As equinocandinas são inibidores não competitivos da enzima $\beta(1-3)$ glucana sintase, uma enzima que catalisa a polimerização de glicose uridina-difosfato em $\beta(1-3)$ glucana, um dos componentes estruturais responsáveis pela integridade e rigidez da parede celular dos fungos. A não formação de $\beta(1-3)$ glucana promove a desestabilização da parede celular e extravasamento de componentes intracelulares, resultando em lise da célula (HECTOR, 1993).

Esses fármacos são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal devido a alta massa molecular e, dessa forma, são usados apenas por via intravenosa. A baixa toxicidade, a lenta metabolização, permitindo uma única aplicação diária, as raras interações medicamentosas e o amplo espectro de ação - incluindo *Candida* e *Aspergillus* - dão a essa classe boas razões para o uso na clínica. Terapia combinada entre equinocandinas e anfotericina B ou azóis

geralmente conduz a um efeito sinérgico ou, no mínimo, aditivo (DENNING, 2002).

Caspofungina é indicada para o tratamento de candidemia e candidíase invasiva, para profilaxia de infecções fúngicas e para o tratamento de aspergilose invasiva quando azóis ou anfotericina B são ineficientes. Micafungina é usada para o tratamento de candidemia e indicada particularmente para profilaxia de infecções fúngicas em pacientes com transplante de medula óssea (CAPPELLETY & EISELSTEIN-MCKITRICK, 2007).

A Figura 5 resume as principais formas de tratamento para infecções fúngicas sistêmicas:

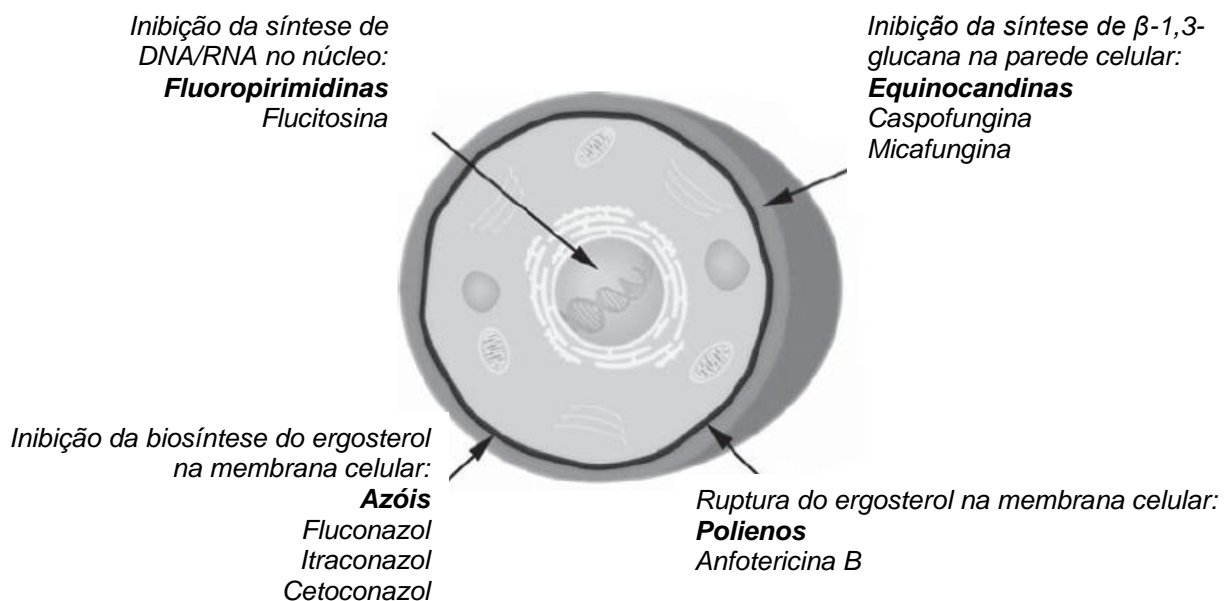


Figura 5. Alvos dos antifúngicos: parede celular, membrana celular e núcleo.
Fonte: Adaptado de CHANDRASEKAR, 2011.

1.1.2 Incidência e mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos

A incidência das infecções fúngicas tem aumentado drasticamente nas últimas três décadas e foi simultaneamente acompanhada pelo aumento da resistência adquirida e inata aos agentes antifúngicos (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Os mecanismos desenvolvidos pelos micro-organismos para combater os efeitos fungicidas e fungistáticos de todas as classes de antifúngicos são baseados em três tipos: (1) redução do acúmulo de fármaco dentro da célula devido à expressão aumentada de genes codificadores para transportadores; (2) diminuição da afinidade do fármaco pelo alvo por mutação e/ou diminuição da expressão do alvo; e (3) modificações do metabolismo, como a síntese *de novo* de pirimidinas. Em alguns isolados clínicos altamente resistentes, como amostras de pacientes em tratamento prolongado, esses mecanismos de resistência podem estar combinados. O aumento da resistência nesses pacientes se deve ao fato de uma aquisição sequencial dos diferentes mecanismos (MINNEBRUGGEN *et al.*, 2010; SANGLARD *et al.*, 2002).

Diante desse quadro, tratamentos antifúngicos atualmente disponíveis são limitados, especialmente no caso de infecções sistêmicas. Além disso, não ocorreram avanços significativos nas terapias desenvolvidas recentemente, o que ressalta a necessidade de investigar tratamentos alternativos com moléculas novas e mais efetivas. Uma fonte são os compostos provenientes de fontes naturais, como plantas e micro-organismos. Deve-se ressaltar que aproximadamente 80% dos antibióticos utilizados na clínica são derivados de produtos naturais, também conhecidos como metabólitos secundários. Esses compõem um reservatório privilegiado de moléculas selecionadas para a interação com uma variedade de alvos biológicos no meio ambiente, fornecendo uma vantagem para o organismo que as produzem (ROEMER *et al.*, 2011).

1.2 Cenário das leishmanioses

As leishmanioses representam um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo uma das causas significativas de morbidade e mortalidade em 22 países do Novo Mundo e 66 países do Velho Mundo (ASSCHE *et al.*, 2011; BRASIL, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano e 70 mil mortes anualmente (RICHARD *et al.*, 2010).

A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada (MCCALL *et al.*, 2013; SEIFERT, 2011), sendo endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais no mundo (PATHAK *et al.*, 2011).

Os ciclos de transmissão estão adaptados a ambientes peridomésticos e têm se espalhado para áreas não endêmicas como consequência da urbanização e do desmatamento, sendo os animais domésticos considerados potenciais reservatórios (REITHINGER *et al.*, 2007).

No esforço de definir com maior clareza as espécies do gênero, Lainson e Shaw (1987) propuseram uma nova classificação das leishmanias com a adoção dos subgêneros *Leishmania* (SAF'IANOVA, 1982) e *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1997) elevando, em nível de espécie, leishmanias antes classificadas como subespécies (NEVES *et al.*, 2005; BRASIL, 2006).

De acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grandes grupos: tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar, a forma mais comum, pode ainda ser subdividida em leishmaniose cutânea, mucocutânea e difusa, com manifestações clínicas variando desde pequenos nódulos a uma extensa destruição dos tecidos na pele. Já a leishmaniose visceral é considerada a forma mais severa, na qual os parasitos migram para diversos órgãos vitais causando febre prolongada, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia. Em poucos meses, os pacientes tornam-se gradualmente doentes e, se não tratados, vão a óbito (TIUMAN *et al.*, 2011).

1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Aproximadamente 1,5 milhões de novos casos por ano correspondem à forma tegumentar da leishmaniose, enquanto 500.000 novos casos por ano estimam-se ser visceral. A forma tegumentar é endêmica em mais de 70 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (TIUMAN *et al*, 2011) (Figura 6).

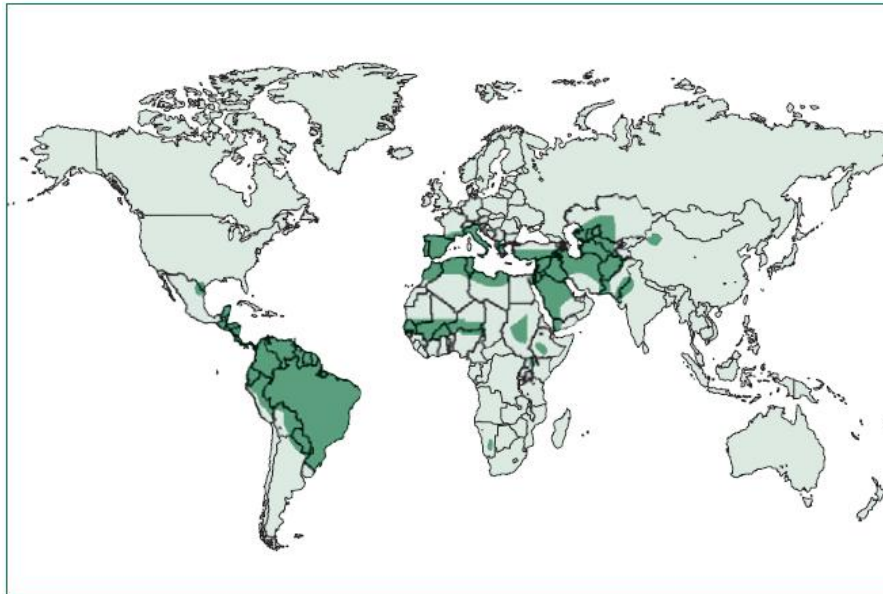


Figura 6. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar (verde escuro).
Fonte: REITHINGER *et al.*, 2007.

O aumento no número de casos se deve em parte à melhora do diagnóstico e notificação dos casos, porém é uma consequência também do controle inadequado dos vetores e reservatórios, aumento da detecção de leishmaniose tegumentar associada com doenças oportunistas (por exemplo, SIDA) e a emergência da resistência aos agentes antileishmania disponíveis atualmente. Ainda assim, esses dados são subestimados uma vez que muitas infecções são assintomáticas ou subnotificadas (REITHINGER *et al.*, 2007).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece destaque devido a sua magnitude, bem como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano. Como pode ser considerada

uma doença ocupacional, há também o envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico (BRASIL, 2007).

As alterações no organismo, sequenciais à presença do parasito, dependem da infectividade e antigenicidade da *Leishmania* e da imunidade e resistência já existentes ou desenvolvidas pelo hospedeiro após a infecção. Em decorrência dessa interação parasito-hospedeiro, o espectro clínico é variável, podendo essa forma ser classificada em dois pólos: o pólo anérgico, onde não há resposta imune celular e estaria a forma cutânea difusa; e o pólo hiperérgico, onde a resposta imune celular está exacerbada correspondendo à forma mucosa. As outras formas de leishmaniose tegumentar estariam inseridas no intervalo entre os pólos, podendo um mesmo paciente evoluir dentro desse espectro ao longo do tempo (BRASIL, 2006) (Figura 7).

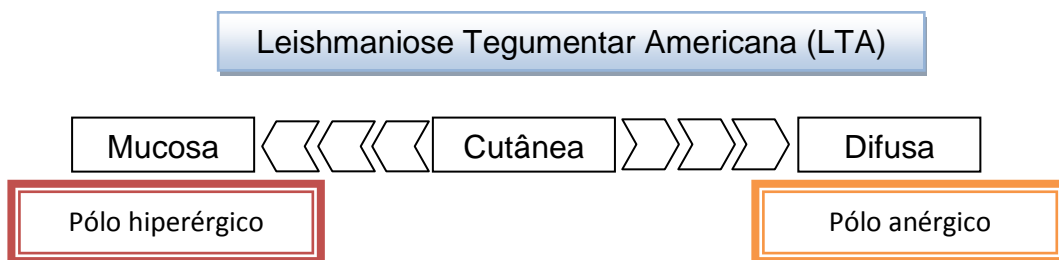


Figura 7. Espectro clínico da LTA. Fonte: BRASIL, 2006.

1.2.1.1 Agente etiológico

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae. No Novo Mundo são atualmente reconhecidas onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doenças humanas (BRASIL, 2007) (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de *Leishmania* causadoras de doenças humanas no Novo Mundo.

Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson & Shaw, 1972)	Acometimento Clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (V.) brazilienses</i> Vianna, 1911	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>Leishmania (V.) peruviana</i> (Velez, 1913)	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)		Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sul-americano
<i>Leishmania (V.) panamensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)		América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> (Silveira <i>et al.</i> , 1987)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>Leishmania (V.) naifti</i> (Lainson <i>et al.</i> , 1990)		Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) shawi</i> (Shaw <i>et al.</i> , 1991)		Região Amazônica
Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf' lanova, 1982)	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	México e América Central
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (Lainson & Shaw, 1972)		América Central e regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do Brasil
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i> (Medina & Romero, 1959)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	Venezuela

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2006.

Esses agentes são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (REITHINGER, 2007) (Figuras 8 e 9).

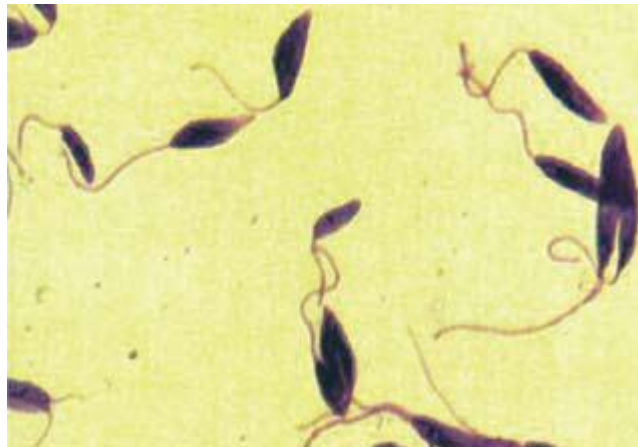


Figura 8. Forma flagelada ou promastigota de *Leishmania*.
Fonte: BRASIL, 2007.

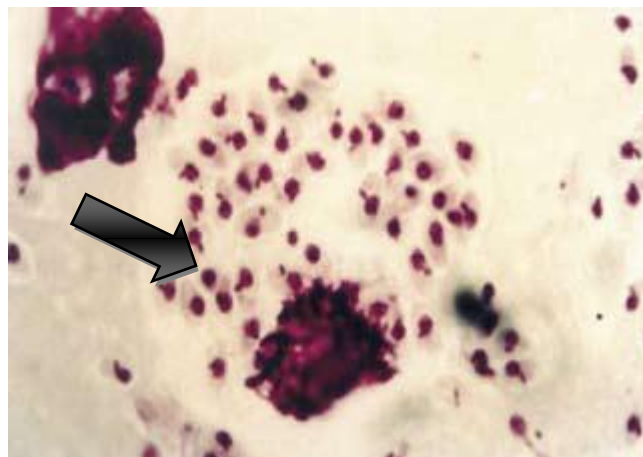


Figura 9. Forma aflagelada ou amastigota de *Leishmania*.
Fonte: BRASIL, 2007.

1.2.1.2 Vetor

Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*. São conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da localização geográfica (MITROPOULOS *et al.*, 2010) (Figura10).



Figura 10. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada. Fonte: BRASIL, 2007.

1.2.1.3 Hospedeiros e reservatórios

São considerados reservatórios da LTA as espécies de animais que garantam a circulação de leishmanias na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço. Infecções por leishmanias que causam a LTA foram descritas em varias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) (BRASIL, 2007).

Com relação aos animais silvestres, há registros de manifestações da doença em roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. Já nos animais domésticos, a LTA pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana, ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2007).

1.2.1.4 Ciclo de transmissão

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor inocula promastigotas de *Leishmania* na pele, que invadem ou são fagocitadas por células do hospedeiro recrutadas ou no local, principalmente macrófagos. Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos residentes, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas. As amastigotas replicam e podem, então, infectar outros macrófagos, tanto no local quanto aqueles em tecidos distantes após

disseminação. Quando, novamente, ocorre o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o inseto vetor inocula formas amastigotas, que se diferenciam em promastigotas no intestino desse inseto. Os parasitos, então, migram para a porção anterior do trato digestivo, completando o ciclo de vida da leishmania (MCCALL *et al.*, 2013) (Figura 11).

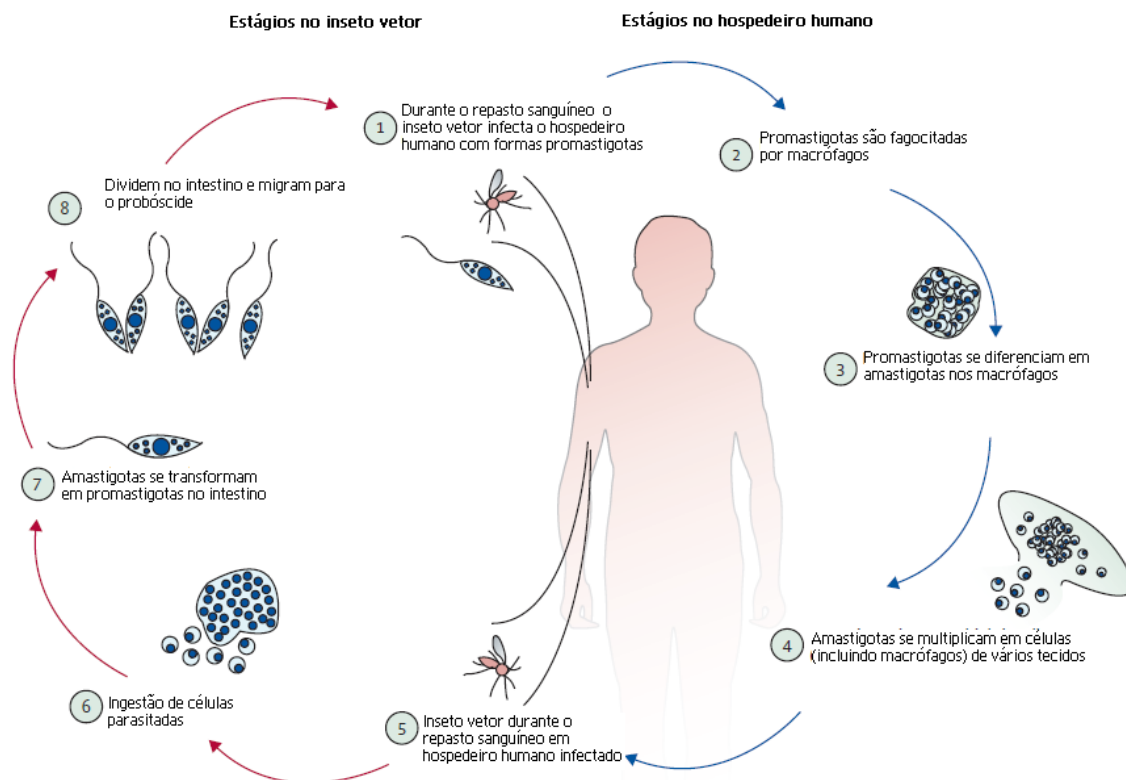


Figura 11. Ciclo de transmissão de leishmaniose.
Fonte: Adaptado de REITHINGER, 2007.

Ressalta-se que esse ciclo de transmissão varia de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros (BRASIL, 2007).

1.2.1.5 Tratamento

O objetivo do tratamento é acelerar o processo de cura, reduzir o risco de escaras e prevenir a progressão da doença. A escolha do tratamento depende do tamanho e da localização da lesão, o número de lesões e o potencial de disseminação (AMEEN, 2010).

O critério de cura é clínico e recomenda-se, após a cura, que o paciente seja acompanhado durante 12 meses do término do tratamento e, se possível, passe por uma nova reavaliação após 24 meses. Na forma cutânea, por exemplo, o critério é definido pela epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e do eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (Figura 12). Entretanto, nos casos com cicatrização progressiva das lesões sem cumprir completamente com os critérios de cura, sugere-se o prolongamento da observação até completar seis meses (BRASIL, 2007).



Figura 12. Lesões ulcerosas no braço e cicatrizes atróficas seis meses após o tratamento. Fonte: BRASIL, 2007.

O critério de cura na forma mucosa é definido pela regressão de todos os sinais e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico (BRASIL, 2007).

1.2.1.5.1 Antimoniato de meglumina

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), utilizados desde 1929, são a primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. A OMS recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg de Sb^{+5} /kg de peso corpóreo/dia, havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados: o antimoniato de metilglucamina e o estibogluconato de sódio. Este último não é comercializado no Brasil (BRASIL, 2007) (Figura 13).

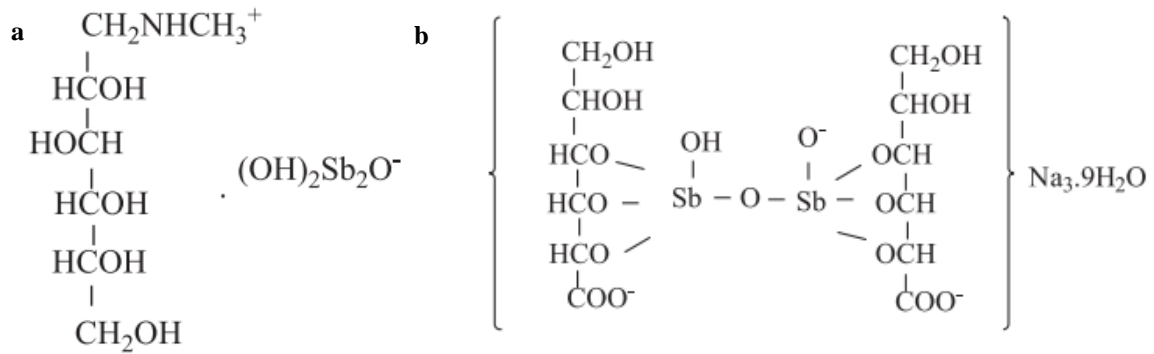


Figura 13. Antimoniais pentavalentes: a) antimoniato de metilglucamina e b) estibugluconato de sódio. Fonte: RATH *et al.*, 2003.

Os antimoniais pentavalentes são fármacos considerados leishmanicidas, pois interferem na bioenergética por meio de glicólise e beta-oxidação das formas amastigotas de *Leishmania*. São considerados pró-medicamentos que requerem redução à forma trivalente para exercerem a atividade biológica. O local da redução (macrófago, amastigota ou ambos) e o mecanismo (enzimático ou não enzimático) permanecem não esclarecidos. Recentes estudos sugerem como mecanismo de ação a inibição da glicólise e da beta-oxidação de ácidos graxos. Alvos específicos desta via ainda não foram identificados (SEIFERT, 2011).

O principal efeito adverso do Sb^{+5} é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Este efeito é dose e tempo-dependente, traduzindo-se por distúrbio de repolarização (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.2.1.5.2 Anfotericina B

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, um dos medicamentos de segunda escolha é a anfotericina B, formulação convencional ou lipossomal (BRASIL, 2007) (Figura 14).

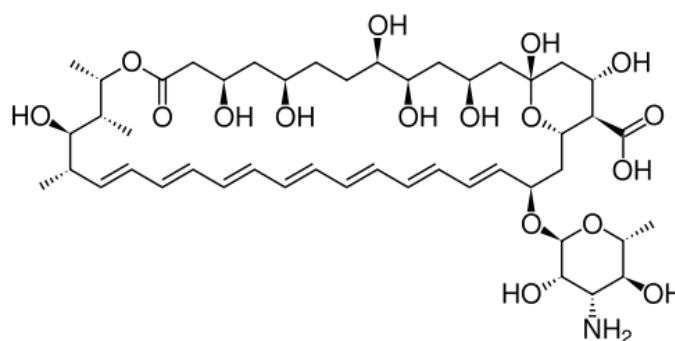


Figura 14. Anfotericina B. Fonte: RATH *et al.*, 2003.

É um fármaco leishmanicida, atuando nas formas promastigotas e amastigotas. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência no ésteres episterol, o precursor do ergosterol, da membrana citoplasmática de *Leishmania* (CHAZALET *et al.*, 1988). É associado com toxicidade durante a infusão – esse medicamento precisa ser administrado de forma lenta – e nefrotoxicidade. A formulação lipossomal, também endovenosa, é menos tóxica, mas significativamente mais cara (MITROPOULOS *et al.*, 2010).

1.2.1.5.3 Pentamidinas

As pentamidinas são diamidinas aromáticas que vêm sendo utilizadas como medicamento de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas. Essa classe também é ativa em certos fungos, como *Candida albicans*. O mecanismo de ação ainda não foi elucidado (MITROPOULOS *et al.*, 2010) (Figura 15).

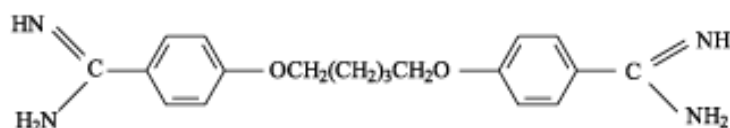


Figura 15. Pentamidina. Fonte: RATH *et al.*, 2003.

Os efeitos adversos mais comuns incluem alta taxa de glicemia, resultante de danos pancreáticos, além de hipotensão, taquicardia e mudanças no eletrocardiograma (OLIVEIRA *et al.*, 2011; MITROPOULOS *et al.*, 2010).

1.2.1.5.4 Outros tratamentos não padronizados no Brasil pelo Ministério da Saúde

Desenvolvido inicialmente como um agente antineoplásico oral, a miltefosina tornou-se o primeiro tratamento oral para a doença em alguns países. É utilizado no tratamento de leishmaniose cutânea e visceral, incluindo infecções resistentes a antimoniais (MITROPOULOS *et al.*, 2010). Os principais efeitos adversos são relacionados à sua administração oral, afetando o trato gastrointestinal, além da elevação dos níveis de aminotransferase e creatinofosfoquinase. A miltefosina também apresenta um potencial teratogênico, não podendo ser administrada em gestantes (TIUMAN *et al.*, 2011).

A paramomicina é o único aminoglicosídeo com atividade clinicamente significativa em leishmania. É utilizada para o tratamento das formas visceral e cutânea (TIUMAN *et al.*, 2011). O tratamento tópico oferece a vantagem da facilidade da administração e apresenta menos efeitos adversos em comparação com o tratamento sistêmico. Em relação aos efeitos adversos, ototoxicidade e nefrotoxicidade são comuns, porém a frequência dessas reações é baixa em doses terapêuticas para leishmaniose (SEIFERT, 2011).

Apesar dos avanços no tratamento para leishmaniose, ainda é necessária a busca por medicamentos menos tóxicos, mais eficazes e mais acessíveis economicamente. As plantas são uma potencial fonte de moléculas líderes (TIUMAN *et al.*, 2011; SAHA *et al.*, 2011).

1.3. Cerrado

O bioma Cerrado é o segundo maior em área do país, ocupando aproximadamente 23% do território nacional (dois milhões de km²), estando localizado basicamente no planalto central e sendo considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica (NETO & MORAIS, 2003). Ocupa a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos estados de Goiás (97%), Maranhão (65%), Mato Grosso do Sul (61%), Minas Gerais (57%) e Tocantins (91%), além de porções de outros seis estados (Fonte: IBGE, 2004) (Figura 16).



Figura 16. Biomas brasileiros. Fonte: IBGE, 2004
(Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br>>. Acesso em: 03/04/2013).

As variações vegetativas encontradas podem ser classificadas de acordo com as características botânicas de cada área. Os ecossistemas distintos incluem: cerradão, que inclui árvores de maior porte, com 12 a 15 m de altura; cerrado *sensu stricto*, que engloba arbustos com 2 a 8 m e cobre de 20 a 70% do bioma; cerrado de campo, que inclui campo sujo e campo limpo, de acordo com a presença ou ausência de indivíduos vegetais maiores; e

matas ciliares ou matas de galeria presentes juntos a rios e córregos (BRANNSTROM *et al.*, 2008).

As plantas são fonte de metabólitos estruturalmente diversos, os denominados metabólitos secundários. Essas moléculas são essenciais para a sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema, representando uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (BEDNAREK & OSBOURN, 2009). Devido a essa interface, a síntese desses compostos é frequentemente afetada por condições ambientais, dentre elas sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, altitude, índice pluviométrico, ataque de patógenos e herbívoros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A riqueza desses metabólitos no bioma Cerrado tem sido reportada na literatura. Há atividade em diversos modelos biológicos, como em *Candida albicans* e *Trychophyton rubrum* (MELO E SILVA *et al.*, 2009), *Plasmodium falciparum* (de MESQUITA *et al.*, 2007), larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES *et al.*, 2005), *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (ALBERNAZ *et al.* 2010; ESPINDOLA *et al.*, 2004).

1.3.1 *Enterolobium ellipticum* Benth.

A espécie *Enterolobium ellipticum* Benth. pertencente à família Fabaceae e conhecida como “favela branca”, é uma árvore pequena de até 5 metros, com folhas compostas, folíolos verde-escuros na parte superior e verde-claros na parte inferior, flores branco-amareladas e frutos vagem coriácea. A madeira é utilizada na construção civil. A seiva da árvore é utilizada para infecções pulmonares (CORRÊA, 1984) (Figura 17).



Figura 17. *Enterolobium ellipticum* Benth. – Fabaceae: árvore (acima), botão floral e flores (abaixo à esquerda), frutos (abaixo à direita).

Outras espécies do gênero têm sua química e/ou atividade biológica relatadas na literatura. *E. contortisiliquum* (Vell.) Morong, utilizada para o tratamento de parasitismo e gonorréia no Brasil, é rica em saponinas triterpenóides. Mimaki e colaboradores (2004) isolaram sete novas saponinas triterpênicas, as contortisilisóides A a G, a partir do extrato aquoso do pericarpo dessa espécie. O contortisilisóide B demonstrou atividade citotóxica para macrófagos BAC1.2F5 (MIMAKI *et al.*, 2004).

Shahat e colaboradores (2008) identificaram a presença de carvona e estragol como constituintes majoritários do óleo essencial dos frutos de *E. contortisiliquum*. O óleo vegetal extraído da semente dessa espécie apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Já o extrato etanólico das sementes de *E. contortisiliquum* foi avaliado com relação à atividade ovicida, larvicida e adulticida em linhagens de *Aedes aegypti*. Observou-se que, acima de 100 µg/mL, esse extrato era capaz de suprimir 100% das larvas adultas de *A. aegypti*, sendo necessário de uma a três horas de exposição (SOUZA *et al.*, 2011; FARIAS *et al.*, 2010).

Já da espécie *Enterolobium saman* (Jacq.) Prain foram isolados cafeína e p-anisaldeído (ISLAM *et al.*, 2012) a partir do extrato metanólico dos frutos dessa espécie.

1.3.2 *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill.

Conhecida como “Gonçalo do campo”, a espécie *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill., também pertencente à família Fabaceae, é uma árvore de até dez metros de altura, com folhas alternas e lanceoladas, flores cor amarelo-ouro aromáticas e fruto vagem curto-pedunculada. É considerada uma espécie ornamental (CORRÊA, 1984) (Figura 18).



Figura 18. *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill. - Fabaceae

A decocção da casca da árvore dessa espécie é utilizada como contraceptivo por comunidades quilombolas e indígenas (RODRIGUES, 2007). Já o extrato bruto da cascado caule, produzido utilizando como líquido extrator a cachaça brasileira, foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana em bactérias - *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; fungos - *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*; forma promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; e poliovírus. Esse extrato demonstrou uma boa atividade apenas em fungos, obtendo uma

Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 125 µg/mL em *C. albicans* e 62,5 µg/mL em *C. parapsilosis* (TOLEDO *et al.*, 2011).

Coelho e colaboradores (2005) ainda relataram o uso da infusão dessa espécie como hepatoprotetora pela comunidade Mumbuca na região oeste do estado do Tocantins.

Já a espécie *Sclerolobium* aff. *guianenses* Benth. é utilizada tradicionalmente na Bolívia para o tratamento de doenças de pele a partir do extrato aquoso da casca do caule. Por ser uma região endêmica para malária, Muñoz e colaboradores (2000) avaliaram a atividade dessa espécie em *Plasmodium berghei* e *Plasmodium vinckei*, linhagens que infectam ratos considerados modelos práticos em laboratório para o estudo da malária humana. O extrato hidroetanólico da casca do caule demonstrou uma boa atividade em *P. vinckei*, com uma inibição de 82% em relação ao controle não tratado.

1.3.3 *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke.

Vatairea macrocarpa (Benth.) Ducke, pertencente à família Fabaceae, é uma árvore de aproximadamente 9 metros de altura, típica do cerrado brasileiro, conhecida como “Amargoso” (devido ao gosto amargo do chá da casca do caule), “Angelim-do-Cerrado” e “Maleiteira” (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Os ramos novos são tomentosos depois glabrescentes, estípulas pequeninas, folíolos - quando adultos são glabros-, brácteas diminutas e pétalas amarelas (CORRÊA, 1984) (Figura 19).

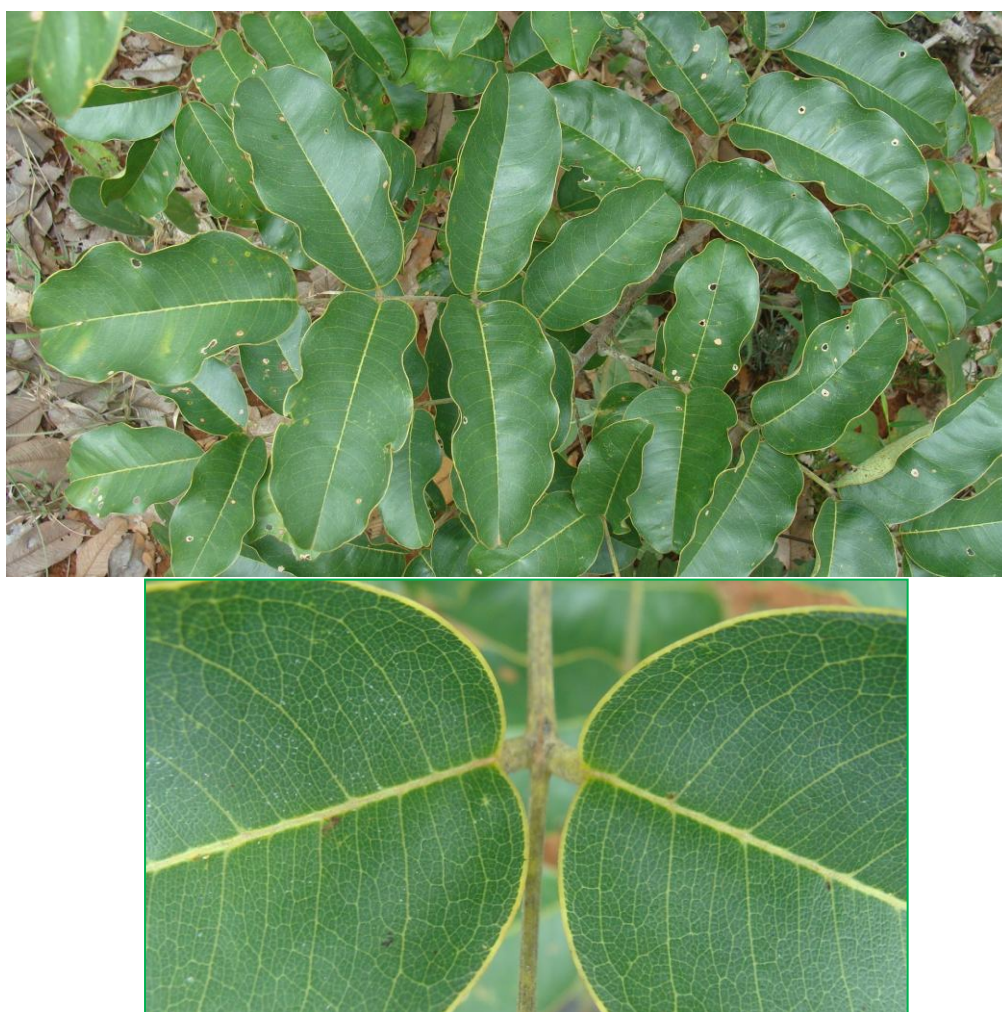


Figura 19. *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke - Fabaceae

Há relatos na literatura do uso da infusão ou maceração com água fria como antiúlcera e antiinflamatório (JESUS *et al.*, 2009). A população do médio e baixo Amazonas utilizam as favas de espécies do gênero *Vatairea* para tratar diversos tipos de micoses superficiais sob a forma de tintura alcoólica ou por

aplicação direta de suas “amêndoas” maceradas. As cascas do caule e da raiz também são utilizadas pela população contra fungos dermatófitos, durante o período em que estas plantas não estão na fase de frutificação (PIEADADE & FILHO, 1988). Matos e colaboradores (1988) demonstraram ainda que o extrato acetônico da planta demonstrou acentuada atividade antibacteriana em *Klebsiella* sp. e *Staphylococcus aureus*. O chá da casca do caule é ainda extensamente utilizado para o tratamento dos sintomas de *diabetes mellitus* (BAVILONI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Sob o aspecto químico, a literatura registra o isolamento de crisofanol, emodina, formonometina, 7-hidroxiflavona, sitosterol e estigmasterol a partir do extrato benzênico do tronco da *V. heteroptera* (Fr. Allem). Constatou-se também a existência de crisofanol nos extratos benzênicos das espécies *V. guianensis* (Aubl), *V. paraensis* (Ducke) e *V. macrocarpa* (FORMIGA *et al.*, 1975). Esse composto já tem atividades antifúngicas, anticancerígenas e bactericidas descritas na literatura (COOPOOSAMY *et al.*, 2006; GARCIA-ROSA *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2006; MATOS *et al.*, 1988). Simatupang e colaboradores (1967, *apud* PIEADADE & FILHO, 1988) ainda descreveram a ocorrência do ácido antronacrisofânico, 9-antronafisciona e 10-antronafisciona no cerne de *V. guianensis* e propõem que essas substâncias poderiam ser as responsáveis por propriedades irritantes à pele. Lecitinas também foram isoladas das sementes e estão relacionadas a processos inflamatórios (ALENCAR *et al.*, 2003; CAVADA *et al.*, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade de extratos de plantas do bioma Cerrado em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e fungos patógenos humanos e selecionar um extrato ativo para o estudo químico.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a atividade biológica dos extratos de *Enterolobium ellipticum* Benth. (Fabaceae), *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill. (Fabaceae) e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Fabaceae)
- Realizar teste de triagem de atividade dos extratos em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*
- Determinar IC₅₀ (concentração que inibe 50%) dos extratos ativos em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*
- Determinar os valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos extratos em fungos dermatófitos e leveduras
- Selecionar um extrato ativo para o fracionamento químico
- Elucidar as estruturas moleculares isoladas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extratos brutos

As espécies vegetais - *Enterolobium ellipticum* Benth. (Fabaceae), *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill. (Fabaceae) e *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Fabaceae) foram coletadas em 2010, na área da Lagoa Formosa/Planaltina-DF, Latitude sul 15° 27' 34,2"; Longitude sul 47° 92' 3,3"; Altitude 1.071 metros, em parceria com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB. As respectivas exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB) para assegurar a autenticidade das espécies coletadas.

Os órgãos vegetais foram separados (casca e madeira do caule e da raiz e folhas), dessecados, estabilizados e pulverizados utilizando um moinho de facas. O material vegetal pulverizado foi pesado e submetido a extrações por maceração com solventes de diferentes polaridades: hexano, acetato de etila e etanol. As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e concentradas a pressão reduzida em rotaevaporador a 40 °C (Figura 20). Os extratos vegetais obtidos foram depositados no Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB, à -20 °C. A atividade de acesso ao patrimônio genético foi autorizada sob o N° 06/2012 de acordo com a Resolução CGEN N° 35, após análise vinculada às informações e termos do processo 02000.002272/2006-73.

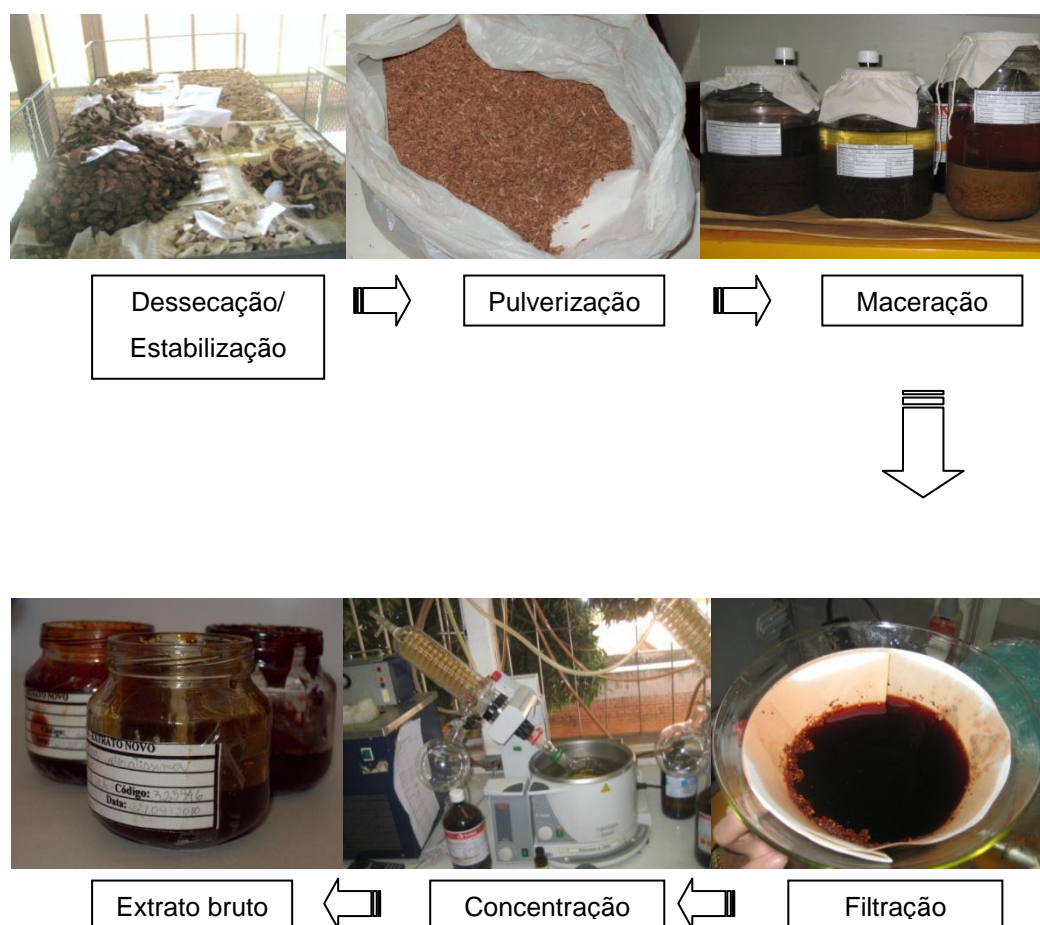


Figura 20. Etapas de produção dos extratos brutos.

3.2 Testes Biológicos

3.2.1 Método de avaliação da atividade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada extrato ou composto foi determinada em leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida glabrata* LMGO 44; e em dermatófitos: *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 09 e *Trichophyton rubrum* LMGO 06, usando técnicas de microdiluição, estabelecida nos protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) sendo o protocolo M27-A3 para leveduras e M38-A2 para fungos filamentosos. Cepas LMGO (Laboratório de Micologia de Goiás) correspondem a isolados clínicos de pacientes do Hospital da Universidade Federal de Goiás.

3.2.1.1 Preparo das amostras e dos controles

Para o teste de microdiluição, os extratos foram diluídos em DMSO a 100 mg/mL. Os controles positivos (obtidos da Sigma[®]) utilizados foram itraconazol e anfotericina B para leveduras e dermatófitos, e fluconazol apenas para leveduras. O itraconazol e a anfotericina B foram diluídos em DMSO na concentração de 1600 µg/mL, enquanto o fluconazol foi diluído em água deionizada, na concentração de 6400 µg/mL. Após a completa dissolução, os controles foram filtrados em filtro Millipore 0,22 µm e armazenados a -20 °C pelo período máximo de três meses.

3.2.1.2 Preparo do meio RPMI 1640 para o teste de microdiluição

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 com vermelho de fenol sem bicarbonato de sódio. O meio em pó (10,4 g) foi reconstituído em água destilada em quantidade suficiente para produzir um litro de meio. Após isso, foi feito o tamponamento com ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até alcançar pH 7.

O meio produzido foi filtrado em sistema de filtração à vácuo utilizando membrana de 0,22 µm na capela de fluxo laminar. Para o controle de esterilidade três alíquotas de 3 mL do meio foram armazenadas em estufa a 37 °C por 5 dias. Após esse período, foi feita a análise da turbidez, e constatando meio límpido este era liberado para uso.

3.2.1.3 Inóculo de leveduras

Para a realização do teste de CIM foi feito o repique das leveduras 48 horas antes do teste. No dia do teste foi feita a transferência de uma pequena alíquota da levedura para um tubo de ensaio contendo solução salina estéril 0,85%, até que se atingisse o grau de turbidez 0,5 na escala de McFarland. Após isso, foi feita a diluição em meio RPMI em duas etapas. A primeira etapa corresponde ao preparo de uma solução 1:100 (suspensão salina: meio RPMI). A segunda etapa consiste em uma diluição 1:20, obtendo-se o inóculo utilizado no teste. A concentração final de células varia de $1-5 \times 10^3$ células/mL.

3.2.1.4 Inóculo de fungos filamentosos

O repique dos fungos filamentosos foi feito cinco dias antes do teste de CIM. No dia do teste a solução salina 0,85% foi transferida para o tubo de ensaio contendo o fungo e, com auxílio de uma alça de platina, foi feita uma raspagem até que fosse alcançada a turbidez 0,5 na escala McFarland. Em seguida foi feita uma diluição em meio RPMI na proporção de 1:50 (suspensão salina: meio RPMI). A concentração final do inóculo utilizado foi de $2-4 \times 10^4$ células/mL.

3.2.1.5 Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de microdiluição foi realizado em placa estéril de 96 poços de fundo arredondado. Inicialmente 100 µL de meio RPMI foram adicionados em todos os poços. Posteriormente foram adicionados 96 µL de meio RPMI e 4 µL dos extratos na 1ª fileira em duplicata e foi feita a diluição seriada. Após isso, foram adicionados 100 µL do inóculo preparado, completando o volume final para 200 µL por poço. Assim, a concentração final do extrato na 1ª diluição foi de 1000 µg/mL. A penúltima fileira da placa corresponde ao controle de crescimento, e contém apenas meio RPMI e fungo. Já a última fileira da placa corresponde ao controle de esterilidade e contém apenas o meio RPMI. Após o término do teste, as placas foram embaladas em filme PVC e incubadas em estufa a 35 °C, por 48 horas no caso de leveduras, e por 5 dias no caso de fungos filamentosos.

A leitura do resultado é feita visualmente, observando o crescimento do fungo no poço. O primeiro poço no qual não se observa crescimento fúngico é considerado o valor de CIM. Caso ocorra a inibição do crescimento do fungo em todos os poços é realizado um novo teste a partir de uma concentração menor da substância.

3.2.2 Método de avaliação da atividade antileishmania

3.2.2.1 Preparo das amostras e do controle positivo

Para todos os testes *in vitro* em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg/mL e concentração final de DMSO inferior a 0,1% (v/v).

O controle positivo utilizado para os testes foi anfotericina B, que foi diluída em DMSO na concentração de 1600 µg/mL. Após a completa dissolução, foi feita a filtração em filtro Millipore 0,22 µm e armazenamento a -20 °C pelo período máximo de três meses.

3.2.2.2 Preparo do meio de cultura

O meio utilizado para a cultura e testes biológicos foi o meio líquido Schneider (Sigma®). Esse meio foi suplementado com 20% de soro fetal bovino e 0,25% de gentamicina para posteriormente ser filtrado em capela de fluxo laminar utilizando o sistema de filtração a vácuo com membrana de 0,22 µm. O armazenamento foi a 4 °C.

3.2.2.3 Cultura de formas promastigotas

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa (L(L)a)-MHOM/BR/PH8 foram mantidas em camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6, no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde/Medicina da Universidade de Brasília. Os parasitos foram obtidos a partir da aspiração do sangue após inoculação de solução salina 0,9% na pata traseira infectada dos animais. Posteriormente os parasitos foram cultivados em meio sólido McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN) a 22 °C por uma semana e em seguida foram transferidos para o meio Schneider Sigma® contendo 20% de soro fetal bovino e gentamicina (pH 7,2 a 22 °C). Após a replicação do parasito no meio foi feita a contagem do número de promastigotas por meio de uma câmara de Neubauer e foi utilizada a concentração de 10⁵ promastigotas /mL para os testes *in vitro*.

3.3.1.4. Triagem da atividade de extratos brutos de plantas

Inicialmente foi realizado um teste de triagem dos extratos vegetais para verificar a atividade do extrato bruto no parasito em placas de 96 poços de fundo chato. Os extratos foram diluídos na proporção de 1:3 em meio Schneider (solução em DMSO: meio de cultura), obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg/mL. Em cada poço foi adicionado 100 µL de meio Schneider, 8 µL de extrato diluído em meio de cultura e 10^5 formas promastigotas de *L.(L.)amazonensis*. Em seguida foi adicionado meio Schneider para completar o volume de 200 µL por poço e a concentração final do extrato foi de 100 µg/mL. A placa foi incubada por 48 horas a 22 °C e foi feita a análise da viabilidade em microscópio invertido.

3.2.2.5 Triagem dos extratos brutos

O teste foi realizado em triplicata e a análise dos resultados foi determinada utilizando um microscópio invertido. A avaliação do movimento dos parasitos foi estimada segundo adaptação descrita por WENIGER e colaboradores (2001) e os critérios da análise foram registrados conforme tabela abaixo:

Tabela 3. Avaliação do teste para triagem dos extratos brutos à 100 µg/mL.

0	100% dos parasitos em movimento	Extrato inativo
+	50% dos parasitos em movimento	Extrato pouco ativo
++	< 50% dos parasitos em movimento	Extrato ativo
+++	100% dos parasitos sem movimento	Extrato muito ativo

Nesse trabalho, os extratos muito ativos (+++) foram selecionados para a determinação do CI_{50} .

3.2.2.6 Determinação de CI_{50}

Para o cálculo do índice de concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI_{50}) a solução estoque dos extratos (10 mg/mL) e o controle positivo anfotericina B (1600 μ g/mL) foram diluídos em meio Schneider na proporção 1:1. Em uma placa de 96 poços foram adicionados, em cada poço da 1ª fileira, 192 μ L de meio de cultura estéril e 8 μ L dos extratos diluídos no meio, totalizando 200 μ L. Nos demais poços foram adicionados 100 μ L de meio Schneider. Com auxílio de uma pipeta multicanal ajustada para 100 μ L foi feita a diluição seriada até a penúltima fileira, desprezando-se ao final os 100 μ L restantes. Em seguida, uma suspensão de 10^5 formas promastigotas foi acrescentada, e o volume final do poço completado para 200 μ L. Dessa forma, a concentração final dos extratos na placa variou de 100 μ g/mL (primeira fileira) a 1,56 μ g/mL (penúltima fileira). Já a concentração do controle positivo variou de 16 μ g/mL (primeira fileira) a 0,25 μ g/mL (penúltima fileira). A última fileira foi destinada ao controle de esterilidade (100 μ L de meio Schneider) e ao controle negativo (suspensão de 10^5 promastigotas em meio Schneider).

A placa foi incubada por 48 horas a 22 °C e posteriormente foi feita a análise da viabilidade dos parasitos utilizando o método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

3.2.2.7 Avaliação dos resultados

Após o período de incubação, foi feita a análise da viabilidade dos parasitos pelo método colorimétrico e enzimático do MTT. A análise é baseada na capacidade das células metabolicamente ativas reduzirem o sal MTT, de cor amarela, ao produto formazan, de coloração violácea (MOSMANN, 1983). Para a avaliação, 20 μ L de uma solução de MTT de 5 mg/mL foram adicionados a todos os poços e a placa foi novamente incubada por 4 h à 22 °C, protegida da luz. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de DMSO para a liberação dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 570 nm para quantificação da metabolização do agente colorimétrico. Estes

experimentos foram realizados em triplicata, permitindo a determinação do CI_{50} pelo programa Prisma GraphPad.

3.3 Purificação e identificação das substâncias isoladas

Um dos extratos estudados foi selecionado para o fracionamento químico devido a características como atividade biológica, rendimento, quantidade e polaridade. O fracionamento foi realizado por meio de técnicas de cromatografia. Os compostos isolados tiveram sua estrutura elucidada por técnicas modernas de espectroscopia, incluindo análises em Ressonância Magnética Nuclear (1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC), e comparando com resultados prévios da literatura.

3.3.1 Métodos cromatográficos

3.3.1.1 Coluna líquida a pressão atmosférica

Na cromatografia de adsorção foi empregada a sílica gel 60 (230-400 mesh - Merck[®]). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade da amostra a ser fracionada. A quantidade de sílica utilizada foi 60 vezes maior que a quantidade de extrato a ser fracionado. Os eluentes utilizados foram ciclohexano, acetato de etila, metanol, ácido acético e água sozinhos ou combinados em gradientes de polaridade crescente. O processo de separação foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD).

Foi feita também coluna de fase reversa RP-18 (Merck LiChrolut[®]) para a separação de amostras de elevada polaridade. Para esse tipo de coluna os eluentes utilizados foram água:metanol (50:50), para estabilização da coluna, e metanol:acetato de etila (50:50).

3.3.1.2 Cromatografia em camada delgada

Para esse procedimento foram utilizadas placas de sílica gel 60 F254 (Merck[®]). As placas foram observadas sob luz UV a 254 e 365 nm. Para a revelação das placas de CCD foi utilizado o revelador universal vanilina

sulfúrica (solução etanólica de ácido sulfúrico 5% e solução etanólica de vanilina 1%). Após a eluição da placa, ela foi pulverizada com a solução e posteriormente aquecida com auxílio de um soprador térmico.

3.3.2 Métodos Espectrométricos

3.3.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de KBr para análise das amostras.

3.2.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500.

O espectrômetro Bruker Avance DRX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,0 T, foi operado nas frequências de 300,13 e 75,47 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. Nos experimentos realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram aplicadas frequências de 500,13 MHz (^1H) e 125,75 MHz (^{13}C), sob um campo magnético de 11,7 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais) e sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) ou piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de Hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27), metanol (δ 3,31), piridina (δ 8,74; 7,58; 7,22) e acetona (δ 2,05). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), metanol (δ 49,17) e piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

Nos experimentos unidimensionais de ^1H e de ^{13}C foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, intervalo para relaxação de 1 s e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. Predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando necessária. O número de transientes variou de 8, para ^1H , a 16384, para ^{13}C , para os experimentos unidimensionais, e 2^n ($n \geq 2$) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram: ^1H (zg), ^{13}C -CPD (zgp), ^{13}C -DEPT 135° (dept135), gs-COSY (cosygp), gs-HSQC (hsqcgpph) e gs-HMBC (hmbclpndqf).

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (HSQC, HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e

magnitude de 10 A. Os valores de J utilizados para os experimentos pertinentes foram ${}^1J_{H,C} = 145$, ${}^nJ_{H,C} = 7$, onde $n \geq 2$.

3.2.2.3 Espectrometria de massa

O espectros de massa de baixa resolução foi obtido por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massas SHIMADZU, modelo QP 5000, DI-50 (DQOI/UFC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação biológica dos extratos brutos

A partir das espécies vegetais *Enterolobium ellipticum*, *Sclerolobium aureum* e *Vatairea macrocarpa* foram obtidos vinte e seis extratos brutos para o estudo, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Extratos brutos produzidos neste estudo

Espécie Família	Parte da planta, solvente	Peso do Extrato Bruto (g)	Rendimento (%)	Número do Herbário
<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth. Fabaceae	MR, h	0,85	0,37	(UB) 3819
	MR, ae	1,68	0,56	
	MR, e	18,74	9,05	
	CR, ae	2,27	1,44	
	MC, h	0,95	0,32	
	MC, ae	2,12	0,61	
	CC, h	1,1	0,55	
	CC, ae	4,88	2,18	
<i>Sclerolobium aureum</i> (Tul.) Baill. Fabaceae	F, ae	15,85	5,64	(UB) 3818
	MR, h	1,27	0,42	
	MR, ae	1,86	0,62	
	MR, e	12,42	6,06	
	CR, ae	0,89	1,98	
	MC, h	1,17	0,25	
	MC, ae	1,99	0,66	
	MC, e	10,4	3,47	
<i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke. Fabaceae	CC, ae	6,2	2,05	(UB) 3815
	F, ae	6,64	4,74	
	MR, h	1,16	0,48	
	MR, ae	2,70	0,90	
	CR, ae	11,83	9,78	
	MC, h	1,28	0,43	
	MC, ae	2,34	0,78	
MC, e	8,92	4,25		
CC, ae	12,5	4,84		
F, ae	9,18	8,58		

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; CC: casca do caule; F: folha. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila; e: etanol.

Do total de vinte e seis extratos, quinze foram acetato de etila, sete foram hexânicos e quatro foram etanólicos (Tabela 4). Durante o processo de extração por maceração, para aqueles órgãos vegetais cuja massa pré-estabelecida não era possível de ser alcançada para as três polaridades do estudo (300 mg de planta dessecada, estabilizada e pulverizada/polaridade), foi priorizado os solventes na seguinte ordem: (1) acetato de etila, (2) hexano e (3) etanol. Essa sequencia priorizou a extração de compostos de polaridade intermediária e apolares devido a uma maior experiência prévia do grupo de trabalho desse estudo para o isolamento desses compostos. Esta habilidade foi desenvolvida graças às observações de atividade de extratos e compostos desta faixa de polaridade em alvos biológicos priorizados pelo grupo.

Os extratos foram inicialmente avaliados quanto à atividade antifúngica em leveduras e fungos filamentosos (Tabela 5). Em nosso trabalho foi estabelecido como critério valor de CIM $\leq 125 \mu\text{g/mL}$ para que o extrato fosse considerado promissor (ALBERNAZ *et al.*, 2010). Aproximadamente 85%, ou seja, 22 extratos apresentaram este valor de CIM em pelo menos um dos fungos. Os 26 extratos testados em 5 espécies de fungos, equivalentes a 130 testes, em triplicata, resultou em 71 testes com CIM entre 125 e $0,12 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 5 e Figura 21); sendo 14 testes ativos à $31,25 \mu\text{g/mL}$; 12 à $15,62 \mu\text{g/mL}$; e 10 à $1,95 \mu\text{g/mL}$. Vale destacar ainda que em 4 testes o valor de CIM foi de $0,12 \mu\text{g/mL}$ para as espécies de *Candida*, atividade bem superior aos controles positivos fluconazol - CIM entre 0,5 e $4 \mu\text{g/mL}$, e anfotericina B – CIM de 4 e $16 \mu\text{g/mL}$.

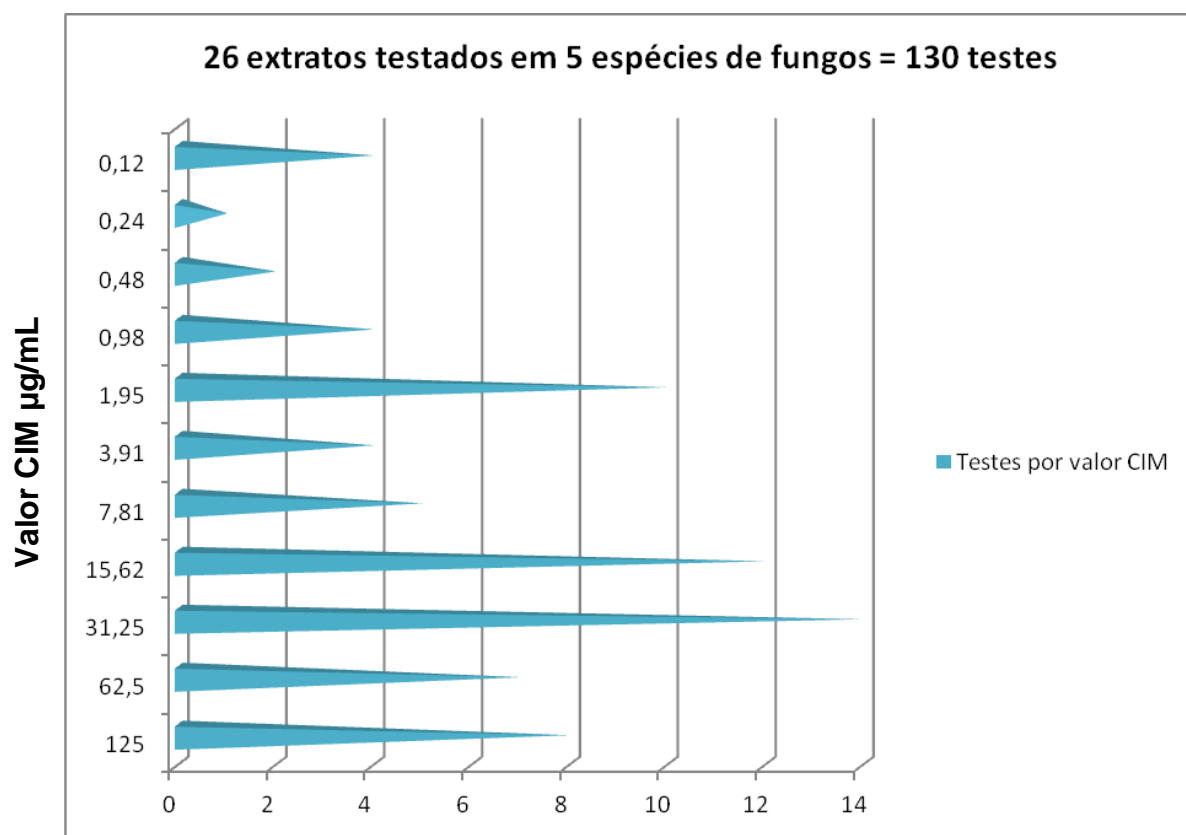


Figura 21. Resultados obtidos com 130 testes (em triplicata) realizados para os 26 extratos em 5 espécies de fungos (*Candida* spp. e *Trichophyton* spp.) – 71 testes apresentaram CIM entre 125 e 0,12 µg/mL.

As infecções fúngicas têm aumentado nas últimas décadas, destacando-se as causadas pelo gênero *Candida*, como a candidíase orofaríngea e vulvovaginal. Infecções por *Candida* spp. não são restritas à superfície da mucosa uma vez que podem se tornar invasivas e sistêmicas. A mortalidade associada a essas infecções varia de 14,5 a 49% nos adultos. Diante desse cenário, os resultados encontrados são promissores para a busca de novos compostos que atendam à demanda crescente de tratamento (TSAI *et al.*, 2013).

A espécie *Enterolobium ellipticum* mostrou, em geral, os melhores resultados em *C. parapsilosis* ATCC 22019, onde todos os seus extratos acetato de etila foram ativos com valores de CIM entre 125 e 3,91 µg/mL. E para *C. albicans* ATCC 10231, o extrato acetato de etila da madeira do caule foi considerado o mais promissor com CIM de 0,98 µg/mL, valor inferior ao fluconazol – CIM de 1 µg/mL, e anfotericina B – CIM de 4 µg/mL. A atividade

antifúngica de *Enterolobium ellipticum* ainda não havia sido relatada na literatura.

A espécie *Sclerolobium aureum* demonstrou amplo espectro de atividade de seus extratos acetato de etila e etanólicos da madeira e casca da raiz e do caule. Em *C. albicans* ATCC 10231 os valores de CIM variaram de 7,81 a 0,12 µg/mL, sendo o melhor resultado com o extrato etanólico da madeira do caule (CIM = 0,12 µg/mL). Esse mesmo extrato apresentou ainda igual valor de CIM nas outras duas leveduras, destacando-se o resultado em *C. glabrata* LMGO 44, por ser esse um isolado clínico resistente a agentes antifúngicos (PFALLER *et al.*, 2012; KROGH-MADSEN *et al.*, 2006). Esse valor de CIM ainda foi inferior aos obtidos pelos controles fluconazol e anfotericina B para as três leveduras e igual ao obtido pelo controle itraconazol em *C. glabrata* LMGO 44 e *C. albicans* ATCC 10231 (Tabela 5). Toledo e colaboradores (2011) já haviam demonstrado que o extrato bruto da casca do caule de *S. aureum*, produzido utilizando como líquido extrator a cachaça brasileira, era ativo em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, obtendo CIM de 125 e 62,5 µg/mL, respectivamente. No entanto, o presente estudo demonstrou que a casca do caule, quando macerada em acetato de etila, produziu extrato com atividade antifúngica mais promissora que a descrita na literatura, com CIM de 7,81 µg/mL para o isolado clínico resistente *C. glabrata* LMGO 44 (Tabela 5). Esse perfil diferenciado de polaridade também foi encontrado no trabalho de Duraipandiyan e Ignacimuthu (2011), no qual foi verificado que os extratos acetato de etila promoveram uma inibição no crescimento de uma maior quantidade de fungos, quando comparado com extratos hexânicos e metanólicos.

Ainda para os extratos de *Sclerolobium aureum*, o acetato de etila da madeira da raiz apresenta interessante perspectivas de estudo com valor de CIM de 0,12 e 0,48 µg/mL em *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 10231, respectivamente. E uma atividade em *C. glabrata* LMGO 44 e em *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 09 e *T. rubrum* LMGO 06, com valores de CIM de 31,25 µg/mL. Aliás, dos 9 extratos de *S. aureum* testados nas 2 espécies de *Trichophyton*, mais de 72% foram ativos com valores de CIM de 15, 62 ou 31,25 µg/mL (Tabela 5).

A prevalência das infecções fúngicas superficiais tem aumentado nas últimas décadas, afetando mais de 20 a 25% da população mundial. Considerando a distribuição geográfica, na América as espécies mais frequentemente encontradas são *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os tratamentos disponíveis são prolongados, tornando as falhas terapêuticas recorrentes. Assim, os resultados encontrados contribuem para a busca de compostos mais eficazes (GRANNOUM *et al*, 2013; HAVLICKOVA *et al.*, 2008).

A espécie *Vatairea macrocarpa*, por sua vez, teve todos seus extratos promissores (CIM \leq 125 $\mu\text{g/mL}$) em pelo menos um dos fungos testados (Figura 22). Entre as leveduras, os melhores valores de CIM variaram de 31,25 a 0,24 $\mu\text{g/mL}$. O melhor valor de CIM foi obtido com o extrato etanólico da madeira do caule em *C. albicans* ATCC 10231, sendo inferior ao obtido pelos controles fluconazol (1 $\mu\text{g/mL}$) e anfotericina B (4 $\mu\text{g/mL}$). O extrato acetato de etila da casca da raiz foi considerado promissor para as três espécies de leveduras e as duas espécies de *Trichophyton* testadas. Em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, esse extrato obteve CIM igual a 0,98 $\mu\text{g/mL}$, valor inferior ao obtido com o controle anfotericina B – CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as cepas. Em filamentosos, mais de 81% dos extratos de *V. macrocarpa* foram ativos, com valores de CIM entre 125 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Piedade & Filho (1988) relatam que a população do médio e baixo Amazonas utiliza as cascas do caule e da raiz de *V. macrocarpa* na forma de tintura alcoólica para tratar micoses causadas por fungos dermatófitos. Nesse estudo os extratos preparados à partir destes órgãos vegetais, por maceração em acetato de etila, foram ativos para os dermatófitos testados (Tabela 5).

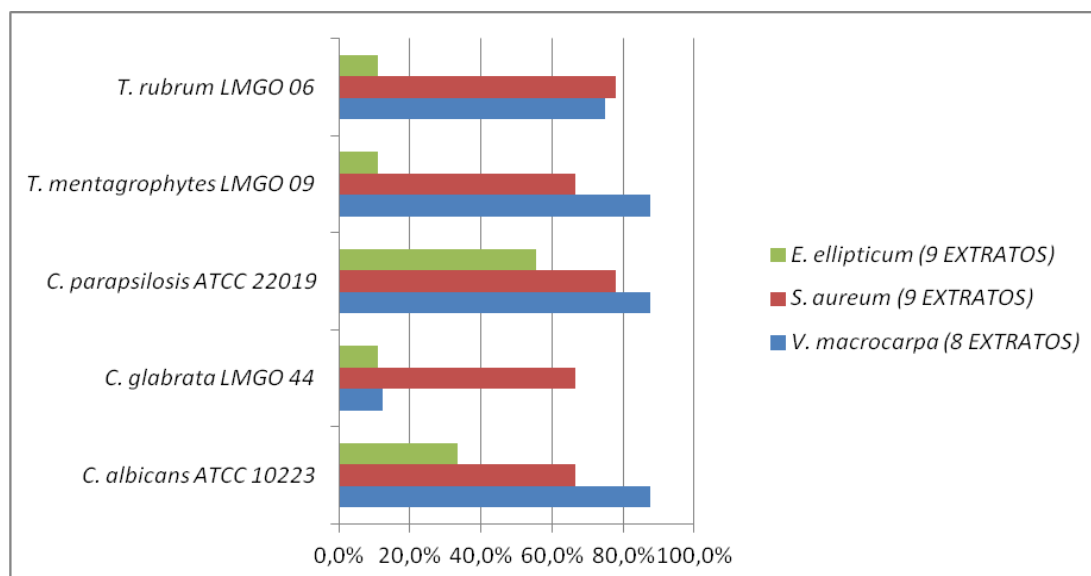


Figura 22. Porcentagem de extratos brutos ativos nos fungos testados ($CIM \leq 125 \mu\text{g/mL}$). *Enterolobium ellipticum* (em verde); *Sclerolobium aureum* (em vermelho) e *Vatairea macrocarpa* (em azul). Em parênteses: total de extratos brutos produzidos à partir de cada espécie vegetal. *T.*: *Trichophyton*; *C.*: *Candida*. Cepas ATCC: American Type Culture Collection. LMGO: isolados clínicos de pacientes.

Posteriormente à avaliação da atividade antifúngica, os extratos foram testados em *L. (L.) amazonensis*. Ressalta-se que os dois modelos biológicos podem, na prática clínica, ser tratados com o mesmo medicamento, como a anfotericina B (KLEPSER, 2011; LEMKE *et al.*, 2005).

Primeiramente, uma triagem (adaptada de Weniger *et al.*, 2001) foi realizada a fim de selecionar os extratos ativos em uma concentração de $100 \mu\text{g/mL}$. Baseado nesta avaliação preliminar, aproximadamente 23% dos extratos foram considerados muito ativos e 15% ativos (Tabela 5). Ou seja, dentre os 26 extratos testados em *L. (L.) amazonensis*, apenas 6 foram considerados muito ativos; e tiveram então os valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados. Pode-se observar que todos estes extratos são da madeira ou casca do caule ou da raiz, e que mais de 83% são apolares (hexânicos) ou de média polaridade (acetato de etila). A raiz e o caule, sobretudo suas cascas, estão sob a ação direta do estresse provocado por fatores externos, como ataques de fungos, bactérias, insetos, ação do fogo, desequilíbrio no teor de micronutrientes, a exemplo do alumínio, e em resposta produzem metabólitos secundários de defesa (BEDNAREK & OSBOURN, 2009). Observamos ainda maior possibilidade de encontrar extratos ativos em leveduras e em

dermatófitos - apesar dos valores de CIM mais elevados -, do que em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. No entanto, ressalta-se a importância da busca por novos tratamentos para leishmaniose, que é considerada uma das doenças negligenciadas no mundo, ou seja, com baixa prioridade para desenvolvimento e ampliação de acesso às tecnologias em saúde (medicamentos, métodos diagnósticos e métodos de controle) (MORAN *et al.*, 2009).

A espécie *Enterolobium ellipticum* Benth. teve quatro dos extratos ativos: extrato etanólico da madeira da raiz ($CI_{50} = 70,05 \mu\text{g/mL}$), extrato hexânico da madeira do caule ($CI_{50} = 78,65 \mu\text{g/mL}$), e extratos hexânico ($CI_{50} = 25,87 \mu\text{g/mL}$) e acetato de etila ($CI_{50} = 9,23 \mu\text{g/mL}$) da casca do caule. Este último extrato se apresenta como sendo o mais promissor, apesar desse valor ser superior ao obtido com o controle anfotericina B ($0,067 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5). A atividade antileishmania de *E. ellipticum* ainda não havia sido reportada na literatura.

A espécie *Sclerolobium aureum*, demonstrou especificidade de ação para os fungos investigados nesse trabalho, pois nenhum de seus extratos foram ativos em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 5). Toledo e colaboradores (2011) demonstraram ser o extrato bruto da casca do caule de *S. aureum*, produzido utilizando como líquido extrator a cachaça brasileira, também inativo em *L. (L.) amazonensis* (CIM = $1000 \mu\text{g/mL}$).

A espécie *Vatairea macrocarpa* teve dois dos extratos ativos: hexânico da madeira da raiz ($CI_{50} = 72,39 \mu\text{g/mL}$) e acetato de etila da casca da raiz ($CI_{50} = 71,47 \mu\text{g/mL}$). Esse último extrato demonstrou também importante atividade para as espécies de *Candida* e *Trichophyton* (Tabela 5). A atividade antileishmania de *V. macrocarpa* ainda não havia sido reportada na literatura.

Tabela 5. Avaliação da atividade antifúngica e antileishmania dos extratos brutos.

Espécie	Extrato		CIM (µg/mL)					Triagem	CI ₅₀ (µg/mL)
	Parte da planta	Solvente	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> LMGO 44	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>L. (L.) amazonensis</i> 100 µg/mL	<i>L. (L.) amazonensis</i>
<i>E. ellipticum</i>	MR	h	250	125	250	500	250	0	>100
		ae	1,95	>1000	3,91	500	62,5	0	>100
		e	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	+++	70,05
	CR	ae	500	>1000	125	500	500	0	>100
	MC	h	>1000	500	1000	1000	500	+++	78,65
		ae	0,98	>1000	31,25	250	250	+	>100
	CC	h	1000	250	500	500	1000	+++	25,87
		ae	>1000	>1000	15,62	125	500	+++	9,23
	F	ae	125	>1000	15,62	250	>1000	0	>100
<i>S. aureum</i>	MR	h	>1000	>1000	>1000	1000	250	0	>100
		ae	0,48	31,25	0,12	31,25	31,25	++	>100
		e	1,95	15,62	3,91	31,25	31,25	0	>100
	CR	ae	7,81	15,62	7,81	15,62	31,25	0	>100
	MC	h	1000	500	500	500	31,25	0	>100
		ae	0,48	15,62	15,62	15,62	31,25	0	>100
		e	0,12	0,12	0,12	15,62	31,25	0	>100
	CC	ae	7,81	7,81	15,62	15,62	31,25	++	>100
	F	ae	250	1000	7,81	>1000	>1000	0	>100
Itraconazol	-	-	0,125	0,125	0,0625	0,25	0,125	-	>100
Fluconazol	-	-	1	4	0,5	4	2	-	>100
Amfotericina B	-	-	4	16	4	4	-	+++	0,067

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; CC: casca do caule; F: folha. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila; e: etanol, (-): não testado. CIM: Concentração Inibitória Mínima. ATCC: American Type Culture Collection. LMGO: isolados clínicos de pacientes. Atividade em Leishmania: 0: inativo; +: pouco ativo; ++: ativo; +++: muito ativo. CI₅₀: Índice de Concentração Inibitória de 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Tabela 5. Avaliação da atividade antifúngica e antileishmania dos extratos brutos.

Espécie	Extrato		CIM (µg/mL)					Triagem	CI ₅₀ (µg/mL)
	Parte da planta	Solvente	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> LMGO 44	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>T. rubrum</i> LMGO 06	<i>L. (L.) amazonensis</i> 100 µg/mL	<i>L. (L.) amazonensis</i>
<i>V. macrocarpa</i>	MR	h	0,98	500	1,95	62,5	500	+++	72,39
		ae	3,91	250	3,91	125	500	+	>100
	CR	ae	0,98	31,25	0,98	62,5	125	+++	71,47
	MC	h	250	>1000	250	1000	125	0	>100
		ae	1,95	500	1,95	62,5	125	0	>100
		e	0,24	500	1,95	31,25	62,5	0	>100
	CC	ae	1,95	250	1,95	31,25	31,25	++	>100
	F	ae	1,95	250	1,95	62,5	62,5	++	>100
Itraconazol	-	-	0,125	0,125	0,0625	0,25	0,125	-	-
Fluconazol	-	-	1	4	0,5	4	2	-	-
Anfotericina B	-	-	4	16	4	4	-	+++	0,067

Partes da planta - MR: madeira da raiz; CR: casca da raiz; MC: madeira do caule; CC: casca do caule; F: folha. Solventes - h: hexano; ae: acetato de etila; e: etanol, (-): não testado. CIM: Concentração Inibitória Mínima. ATCC: American Type Culture Collection. LMGO: isolados clínicos de pacientes. Atividade em Leishmania: 0: inativo; +: pouco ativo; ++: ativo; +++: muito ativo. CI₅₀: Índice de Concentração Inibitória de 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

4.2 Fracionamento químico

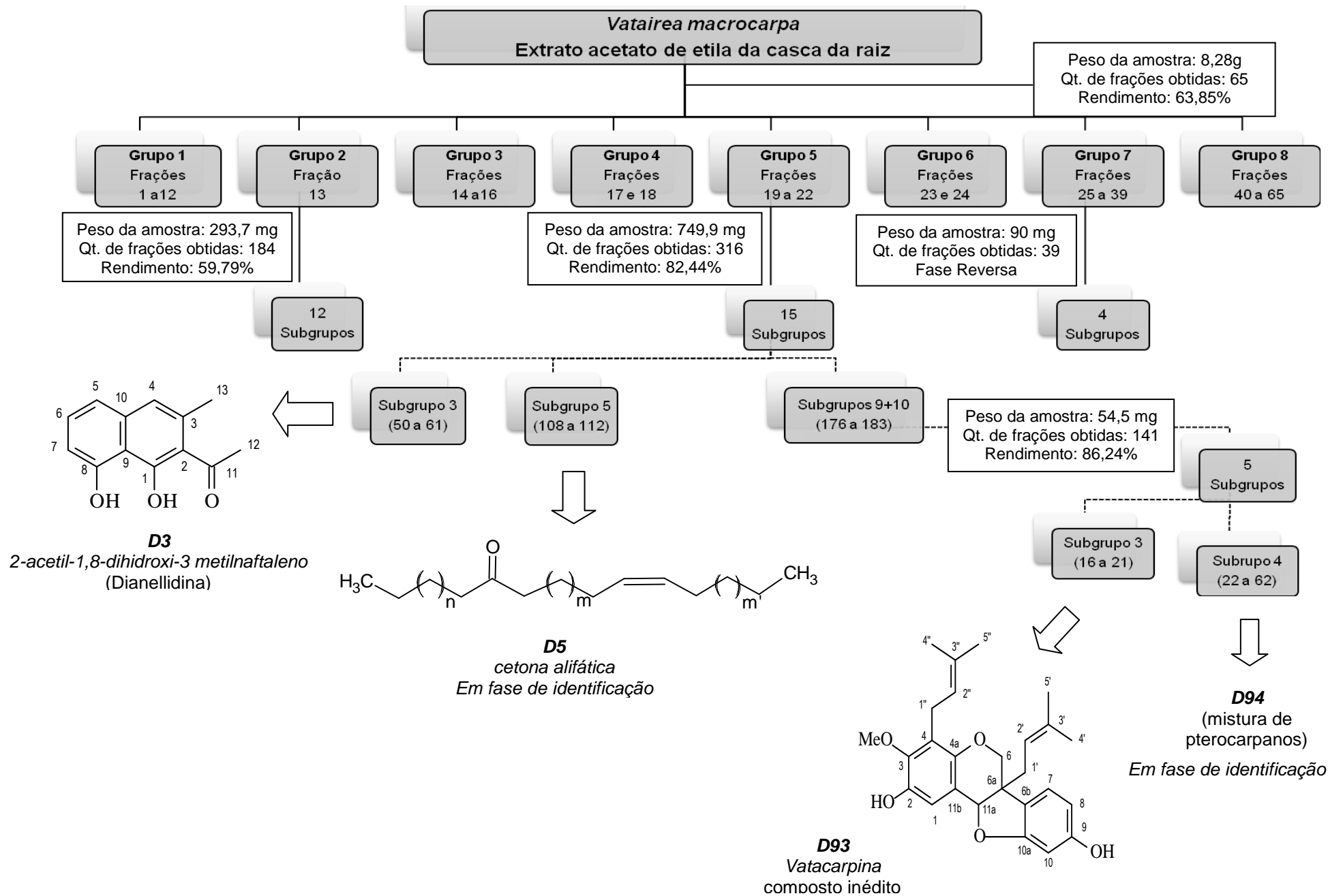
Dentre os extratos testados, o hexânico da madeira da raiz e o acetato de etila da casca da raiz de *Vatairea macrocarpa* demonstraram atividade em fungos e em *L. (L.) amazonensis*. Inspirados na utilização da anfotericina B para o tratamento das infecções causadas por esses micro-organismos; e nos parâmetros de rendimento, quantidade e polaridade, selecionou-se o extrato acetato de etila da casca da raiz de *Vatairea macrocarpa*. Dessa forma, 8,28 g da amostra foram submetidas ao fracionamento em cromatografia em coluna aberta de sílica. Foram obtidas 65 frações, que foram reunidas em 8 grupos após análise comparativa em cromatografia em camada delgada (CCD) (Tabela 6). O rendimento da coluna foi de aproximadamente 63,85%. Desconsiderou-se o último grupo para o cálculo por conter sílica proveniente da própria coluna. Os grupos 2, 5 e 7 foram selecionados para a continuidade do fracionamento químico, após análise dos perfis cromatográficos.

Tabela 6. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa* em coluna aberta de sílica, com rendimento de 63,85%.

Grupos	Frações	Eluentes	Peso (mg)
1	1 a 12	Ciclohexano/Acetato (90:10)	77,60
2	13	Ciclohexano/Acetato (80:20)	293,70
3	14 a 16	Ciclohexano/Acetato (60:40)	258,60
4	17 e 18	Ciclohexano/Acetato (50:50)	299,20
5	19 a 22	Ciclohexano/Acetato (30:70)	749,90
6	23 e 24	Ciclohexano/Acetato (20:80)	607,00
7	25 a 39	Acetato/Metanol (60:40)	2.980,60
8	40 a 65	Metanol	5.150,40

Segue abaixo o fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa* (Figura 23).

Figura 23. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa*



Os grupos 2, 5 e 7 foram selecionados para continuidade do fracionamento.

Após nova cromatografia em coluna aberta de sílica, o grupo 2 (293,70 mg) gerou 184 subfrações reunidas em 12 subgrupos após análise comparativa em cromatografia em camada delgada (CCD) (Tabela 7). O rendimento da coluna foi de 59,79%. Porém, não foi possível o isolamento de nenhuma substância, considerando que os subgrupos apresentavam uma considerável quantidade de impurezas.

Tabela 7. Fracionamento do Grupo 2 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa* em coluna aberta de sílica, com rendimento de 59,79%.

Subgrupos	Subfrações	Eluentes	Peso (mg)
1	1 a 47	Ciclohexano 100%	5,70
2	48 a 59	Ciclohexano 100%	0,40
3	60 a 103	Ciclohexano/Acetato (99,5:0,5)	3,00
4	104 a 121	Ciclohexano/Acetato (97,5:2,5)	93,30
5	122 a 125	Ciclohexano/Acetato (97,5:2,5)	38,30
6	126 a 129	Ciclohexano/Acetato (95:5)	11,50
7	130 a 129	Ciclohexano/Acetato (80:20)	6,3
8	138 a 141	Ciclohexano/Acetato (80:20)	3,50
9	142 a 144	Ciclohexano/Acetato (70:30)	3,70
10	145 a 150	Ciclohexano/Acetato (60:40)	5,7
11	151 a 155	Acetato 100%	2,8
12	156 a 184	Acetato/Metanol (95:5) e Metanol 100%	1,4

O fracionamento em coluna aberta de sílica do grupo 5 (749,90 mg) gerou 316 subfrações reunidas em 15 subgrupos após análise comparativa em cromatografia em camada delgada (CCD) (Tabela 8). O rendimento da coluna foi de 82,44%. O subgrupo 3 (5,10 mg) deu origem ao composto nomeado **D3** identificado como sendo o 2-acetil-1,8-dihidroxi-3 metilnaftaleno, conhecido na literatura por Dianellidina. O subgrupo 5 (7,60 mg) deu origem ao composto nomeado **D5**, que corresponde a uma cetona alifática.

Tabela 8. Fracionamento do Grupo 5 oriundo do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa* em coluna aberta de sílica, com rendimento de 82,44%.

Subgrupos	Subfrações	Eluentes	Peso (mg)
1	1 a 30	Ciclohexano/Acetato (95:5)	5,50
2	31 a 49	Ciclohexano/Acetato (95:5)	1,40
3	50 a 61	Ciclohexano/Acetato (92:8)	5,10
4	62 a 107	Ciclohexano/Acetato (85:15)	21,30
5	108 a 112	Ciclohexano/Acetato (85:15)	7,60
6	113 a 142	Ciclohexano/Acetato (80:20)	43,60
7	143 a 171	Ciclohexano/Acetato (60:40)	95,20
8	172 a 175	Ciclohexano/Acetato (60:40)	14,10
9	176 a 179	Ciclohexano/Acetato (60:40)	27,50
10	180 a 183	Ciclohexano/Acetato (60:40)	40,3
11	184 a 190	Ciclohexano/Acetato (50:50)	67,1
12	191 a 198	Ciclohexano/Acetato (50:50)	61,7
13	199 a 205	Ciclohexano/Acetato (30:70)	54,9
14	206 a 226	Acetato/Metanol (95:5)	17,00
15	227 a 316	Metanol 100%	155,90

Ainda referente a essa mesma coluna, os subgrupos 9 (27,50 mg) e 10 (40,3 mg), após análise das CCDs (Figura 24), foram reunidos e submetidos a nova cromatografia em coluna aberta de sílica. Foram obtidos 141 subfrações reunidas em 5 subgrupos (Tabela 9). O rendimento total da coluna foi de 86,24%. O subgrupo 3 (4,60 mg) deu origem ao composto **D93**, que foi amplamente caracterizado e denominado pelo nosso grupo por **vatacarpina**, um pterocarpano não relatado previamente na literatura.

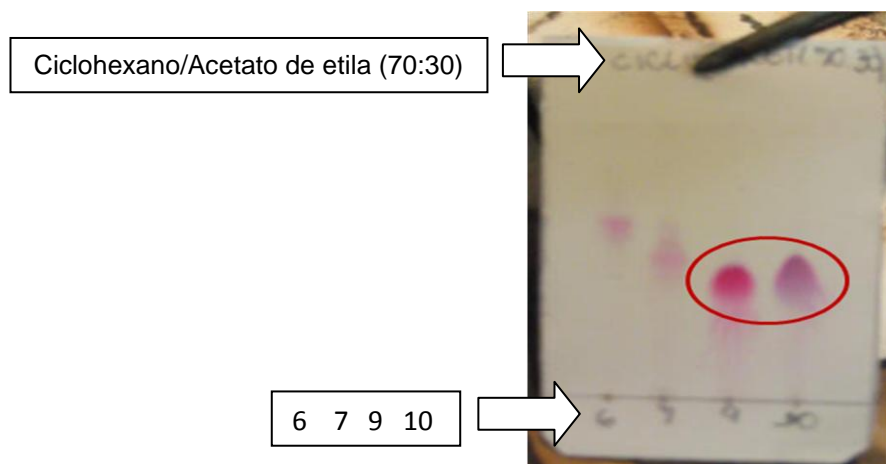


Figura 24. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de subgrupos oriundos do Grupo 5 do fracionamento inicial do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa*. Círculo vermelho: subgrupos 9 e 10 que foram reunidos e submetidos a nova cromatografia em coluna aberta de sílica.

Tabela 9. Fracionamento dos subgrupos 9 e 10 reunidos (provenientes do grupo 5 de *V. macrocarpa*) em coluna aberta de sílica, com rendimento de 86,24%.

Subgrupos (9+10)	Subfrações	Eluentes	Peso (mg)
1	1 a 13	Ciclohexano/Acetato (88:12)	1,90
2	14 e 15	Ciclohexano/Acetato (88:12)	0,70
3	16 a 21	Ciclohexano/Acetato (88:12)	4,60
4	22 a 62	Ciclohexano/Acetato (84:16)	31,60
5	63 a 141	Metanol	8,20

Posteriormente, aproximadamente 90 mg do grupo 7 (2,98 g), oriundo do fracionamento inicial do extrato bruto, foi submetido a cromatografia em coluna aberta de sílica de fase reversa gerando 39 subfrações reunidas em 4 subgrupos (Tabela 10). O rendimento total da coluna foi de 32,33%. Não foi possível o isolamento de nenhuma substância, considerando que os subgrupos apresentavam uma considerável quantidade de impurezas.

Tabela 10. Fracionamento do Grupo 7 oriundo da coluna inicial do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa*, por cromatografia em coluna aberta de sílica de fase reversa, com rendimento de 32,33%.

Subgrupos	Subfrações	Eluentes	Peso (mg)
1	9 a 15	Metanol 100%	2,90
2	16 a 23	Metanol/Acetato (50:50)	1,90
3	24 a 33	Metanol/Acetato (50:50)	0,60
4	34 a 39	Metanol/Acetato (50:50)	23,70

4.3 Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke.

4.3.1 Determinação Estrutural de D3

O fracionamento do grupo 5 do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa* levou à obtenção de um sólido cristalino marrom, que foi denominado **D3**. O composto isolado foi submetido a análises espectrométricas para a sua identificação.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 26, p.77) foram observados sinais correspondentes a sistemas aromáticos penta e trissubstituídos, cujas correlações homonucleares foram devidamente ratificadas pelo espectro COSY expandido (Figura 27, p. 78).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , Figura 28, p. 79) mostrou 13 linhas espectrais, sendo uma delas em δ 205,2 atribuída a carbonila de cetona e outras 10 linhas entre δ 111 e 169 foram características de carbonos pertencentes a anel aromático, sugerindo a presença de dois núcleos benzênicos condensados. Outros dois sinais em δ 25,5 e 32,4 com acoplamentos no espectro de HSQC (Tabela 11, p. 82; Figura 29, p. 80) com os hidrogênios em δ 2,76 e 2,66, indicaram a presença de duas metilas ligadas a carbono sp^2 .

A comparação destes dados com outros reportados na literatura permitiu determinar para este composto a estrutura da dianellidina (2-acetil-1,8-diidroxi-3-metilnaftaleno) e a análise do espectro RMN-HMBC (Figura 30, p. 81) e infravermelho (Figura 31, p. 83) permitiu a confirmação da estrutura proposta (Figura 25).

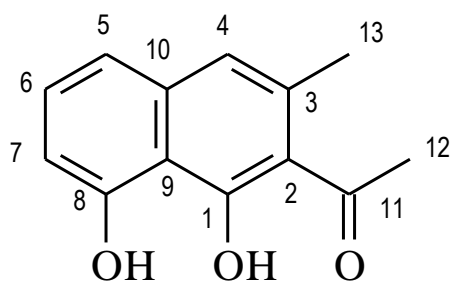


Figura 25. Estrutura molecular da dianellidina (**D3**).

A dianellidina (também conhecida como nepodina e musizina), apresenta várias atividades biológicas descritas na literatura, como antibacteriana, antifúngica para fungos de plantas, antiviral e antitumoral (DIAS *et al*, 2009; CHOI *et al.*, 2004; PALOMBO & SEMPLE, 2001; LI & MCLAUGHLIN, 1989).

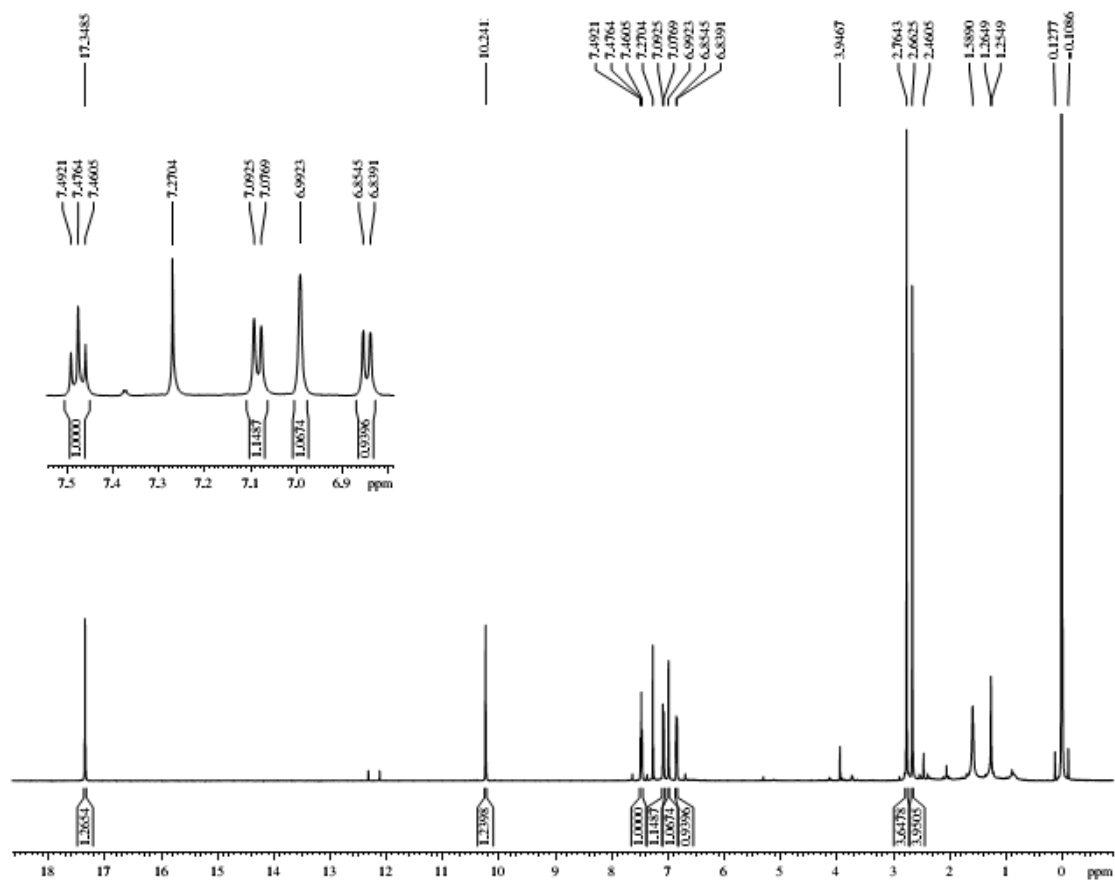


Figura 26. Espectro de RMN ^1H de **D3** (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

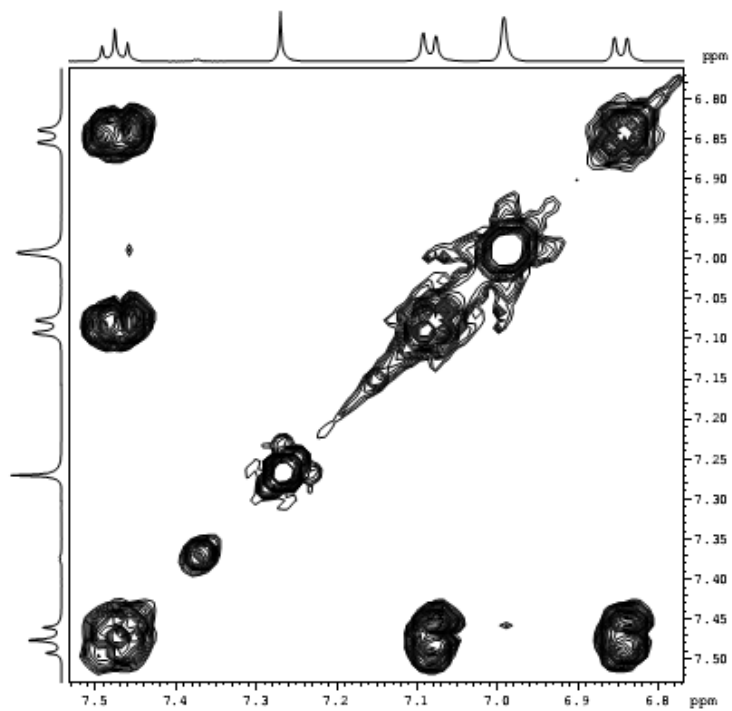


Figura 27. Expansão do espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de **D3**.

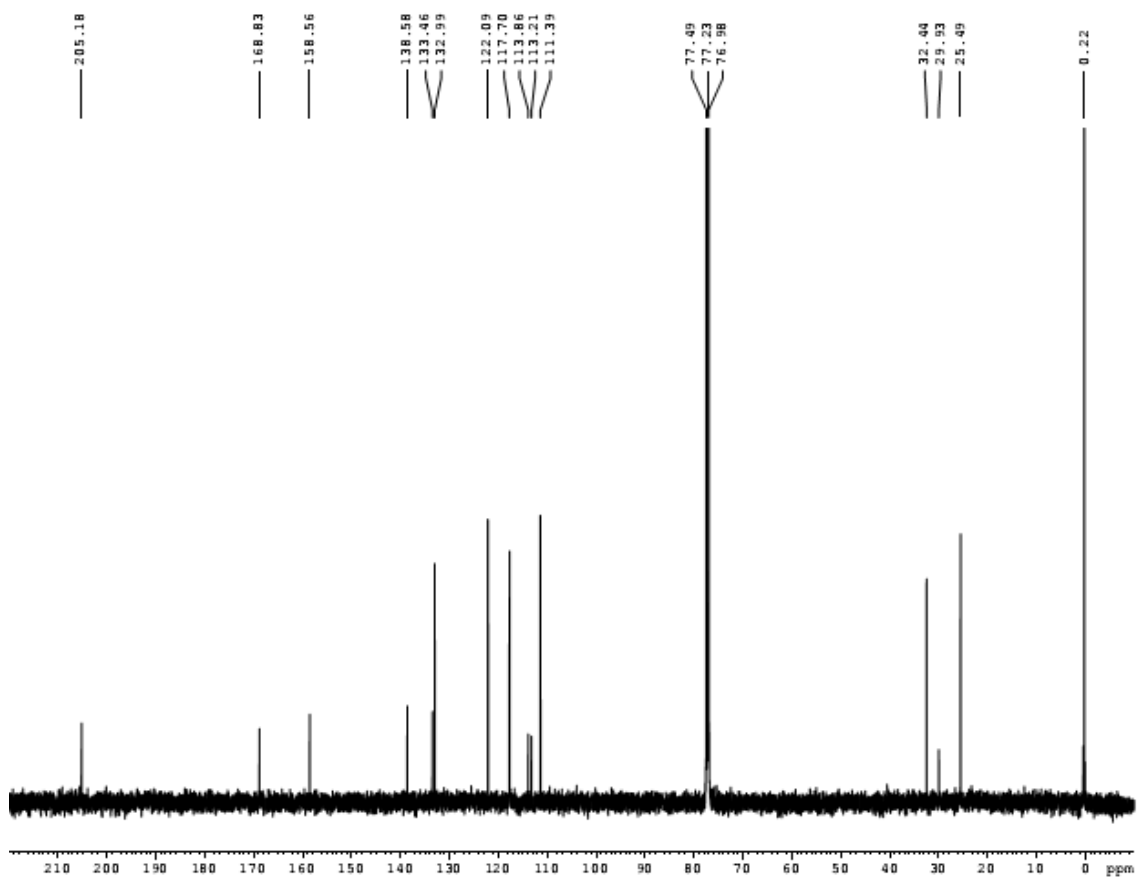


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C de **D3** (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

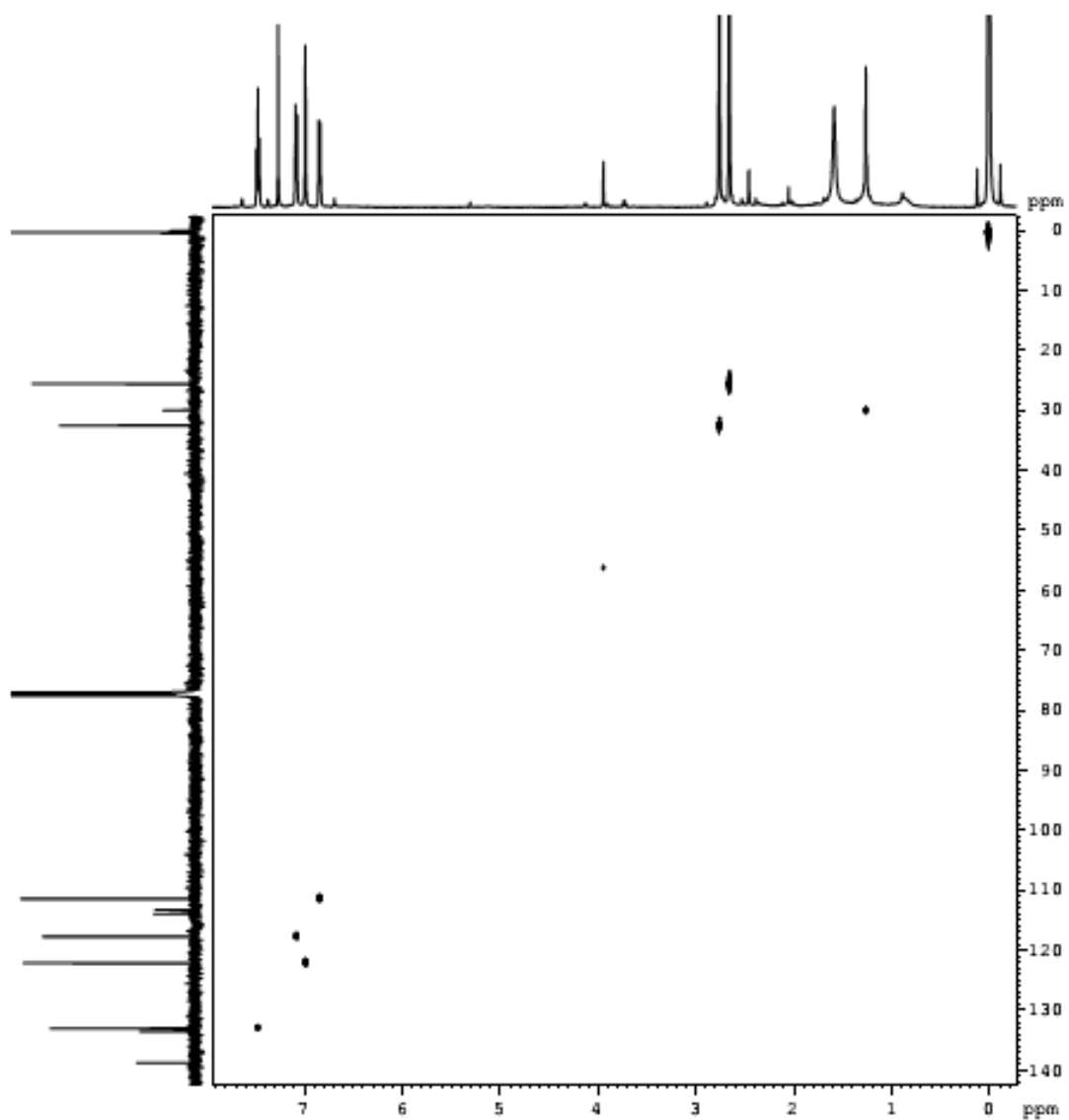


Figura 29. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de **D3**.

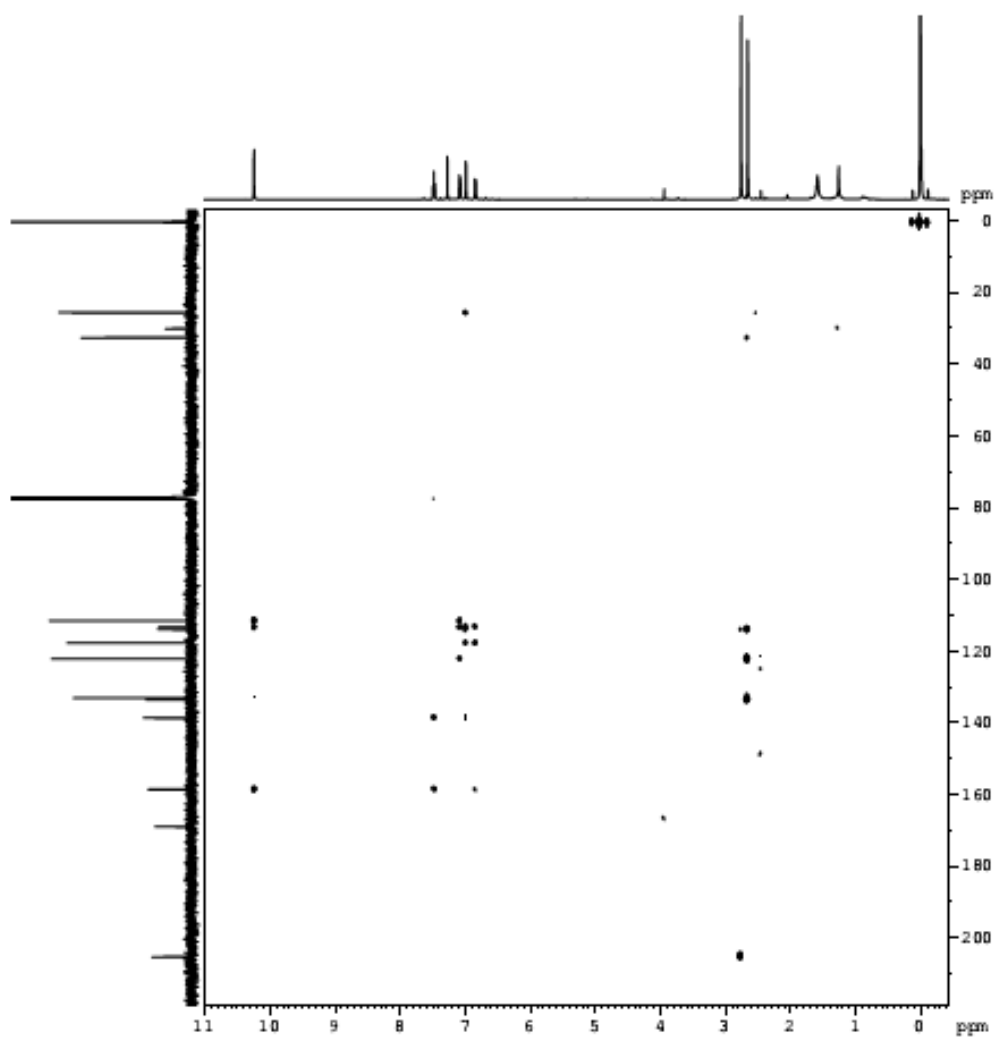


Figura 30. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de **D3**.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de D-3 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC.

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C				
1	168.83	-		
2	113.82	-		H-4; 3H-13
3	132.41	-	3H-13	
8	158.84	-	H-7; HO-8	H-6
9	113.21	-		H-4; H-5; H-7
10	138.41	-	H-5	H-6
11	205.18	-	3H-12	
CH				
4	122.09	6.99 (s)		H-5; 3H-13
5	117.70	7.08 (d, 7.8)		H-4; H-7
6	132.99	7.48 (t, 7.8)		
7	111.39	6.84 (d, 7.8)		H-5
CH₃				
12	32.44	2.76 (s)		
13	25.49	2.66 (s)		
HO				
1	-	17.35 (s)		
8	-	10.24 (s)		

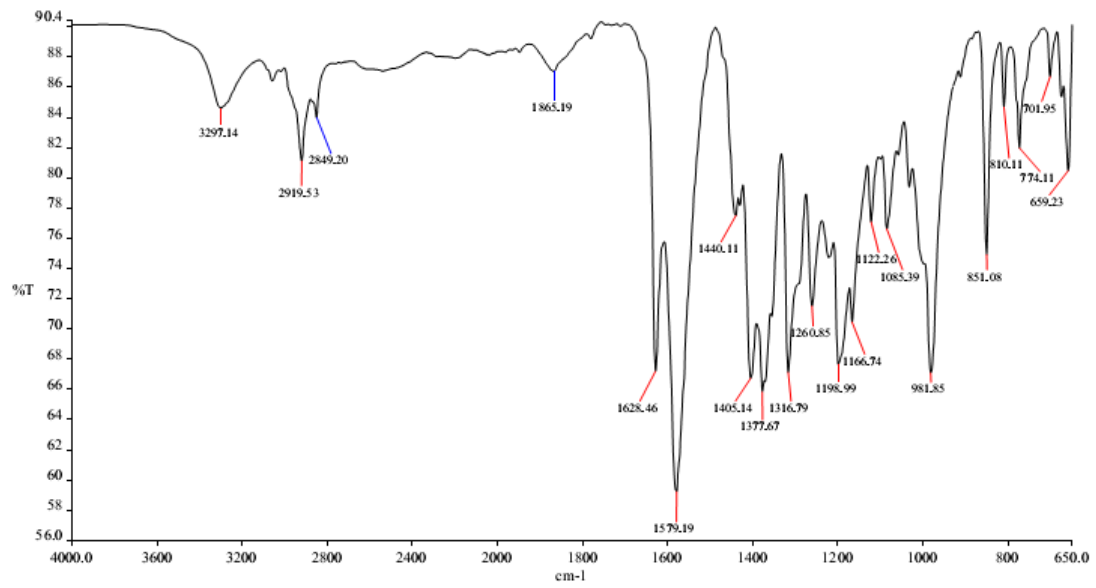


Figura 31. Espectro de absorção na região do infravermelho de **D3**.

4.3.2 Determinação Estrutural de D5

O fracionamento do grupo 5 do extrato acetato de etila da casca da raiz de *V. macrocarpa* levou à obtenção de um sólido cristalino, que foi denominado **D5**. O composto, sugerido ser uma cetona alifática (Figura 32) pelo espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , Figura 33, p. 85), encontra-se em fase de identificação.

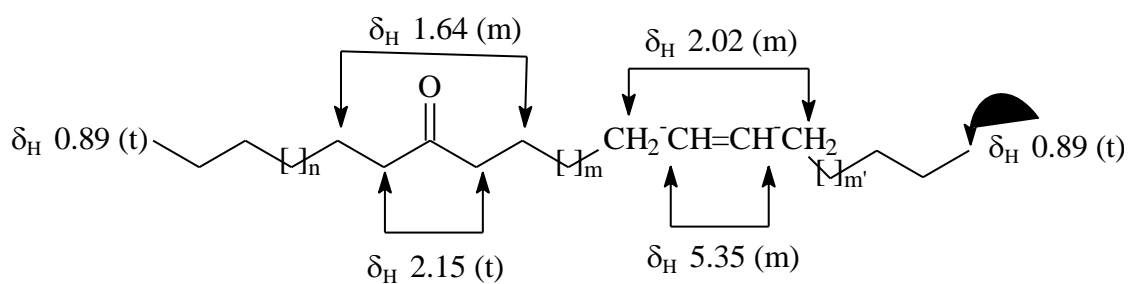


Figura 32. Proposta para a estrutura química de **D5**.

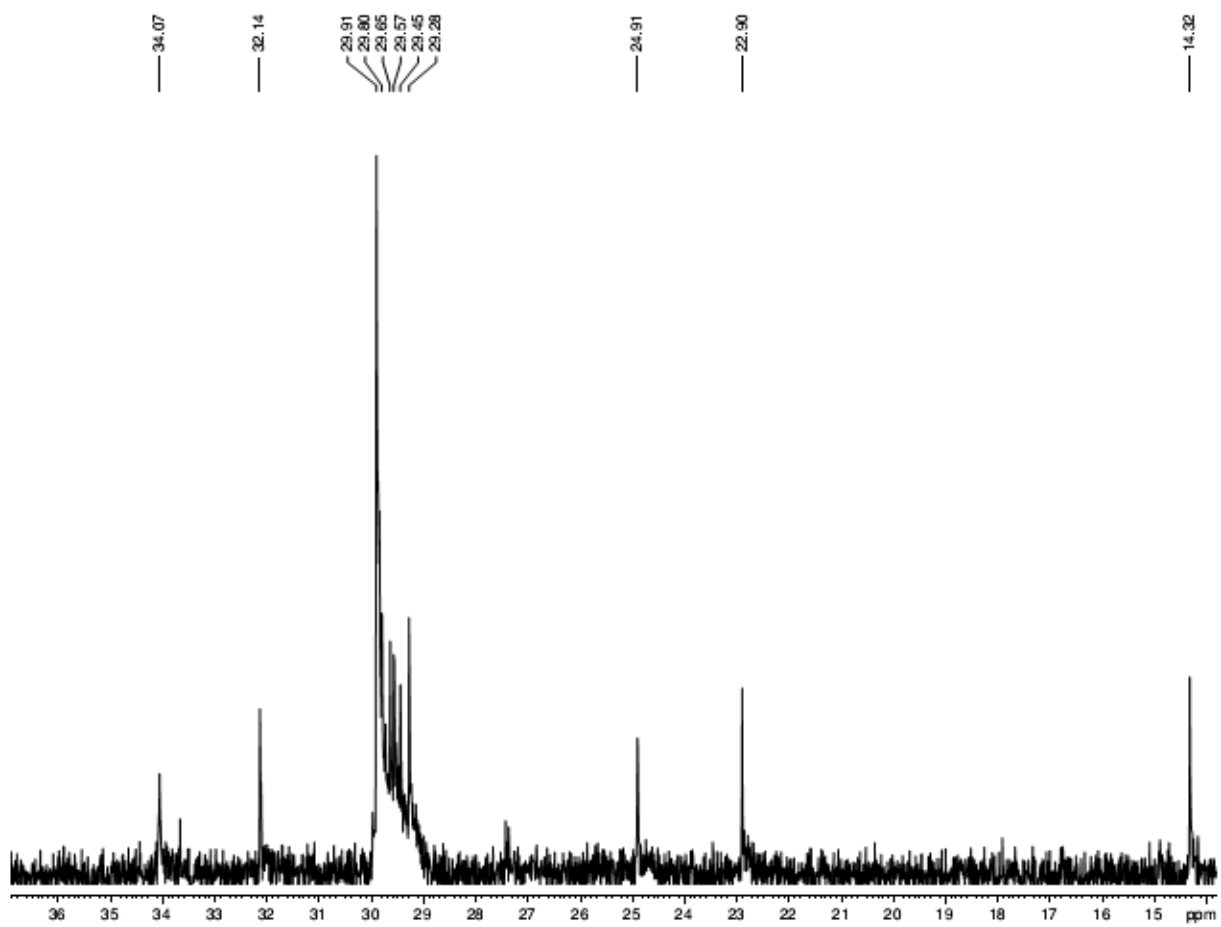


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C de **D5** (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

4.3.3 Determinação Estrutural de D93

O fracionamento dos subgrupos 9 e 10 do grupo 5 do extrato acetato de etila da casca da raiz de *Vatairea macrocarpa* levou à obtenção de um sólido branco, denominado **D93**. O composto isolado foi submetido a análises espectrométricas para a sua identificação.

A interpretação conjunta dos dados permitiu identificar a estrutura do pterocarpano (-)-6aR,11aR-di-hidro-2,8-dihidroxi-3-metoxi-4,6a-diprenil-6H-benzofurano[3,2-c]benzopirano, ainda não reportado na literatura. Esse composto foi nomeado pelo nosso grupo de pesquisa de **vatacarpina** (Figura 34).

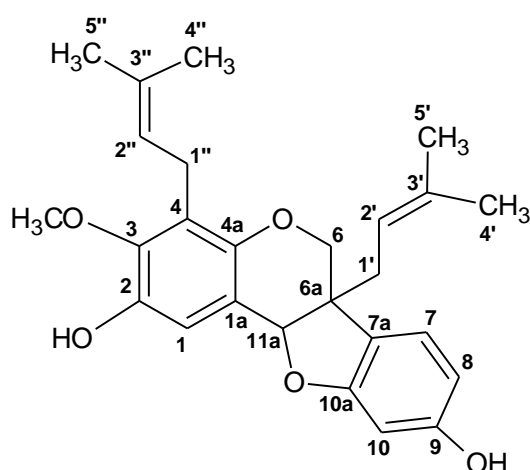
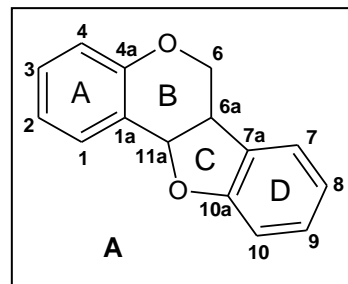


Figura 34. Estrutura química da vatacarpina (**D93**).

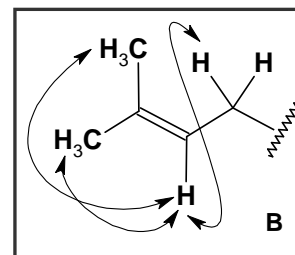
O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 35, p. 89) mostrou uma banda larga em 3384 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila e absorções entre $1116\text{--}1034\text{ cm}^{-1}$ referentes aos estiramentos da ligação C-O de éter e fenol. Observaram-se bandas em 1620 e 1463 cm^{-1} de $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$ que evidenciou o caráter aromático da molécula.

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura 36, p. 90) apresentou sinais característicos dos hidrogênios oximetilênicos e oximetínico, dos anéis B e C, de esqueleto do tipo pterocarpano (Subestrutura A) em δ 4.02 ($\text{H}_{6\alpha}$, d, 10.0), 3.64 ($\text{H}_{6\beta}$, d, $J = 10,0$ Hz) e 5.10 ($\text{H}_{11\alpha}$, s), respectivamente



(ARAUJO *et al.*, 2008). Observaram-se também sinais referentes a dois sistemas aromáticos, um sinal em δ 6,95 (H_1 , s) indicando um anel pentasubstituído e três sinais em δ 7.01 (H_7 , d, 7.9), 6.36 (H_8 , dd, 7.9, 2.2) e 6.34 (H_{10} , d, 2.2) característicos de sistema ABX aromático. Dois fragmentos prenils foram sugeridos pela presença de sinais característicos em δ 1,54 (H_4 , s), 1,66 ($\text{H}_{5'}$, s), 1,70 (H_5 , s) e 1,76 ($\text{H}_{4''}$, s) referentes a quatro grupos metilas, sinais de hidrogênios metilênicos em δ 2,45 ($\text{H}_{1'}$, d, $J=7,5$) e 3,34 ($\text{H}_{1''}$, d, $J=6,5$) e dois sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,23 ($\text{H}_{2'}$, t, $J = 7,8$ Hz) e δ 5,14 ($\text{H}_{2''}$, t, $J = 6,5$ Hz).

O espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY, Figura 37, p. 91) mostrou acoplamentos entre os hidrogênios em δ 2,45 ($\text{H}_{1'}$) e 5,23 ($\text{H}_{2'}$) e deste último com as metilas em 1,54 (H_4) e 1,70 (H_5). Neste espectro ainda foi possível visualizar o acoplamento dos hidrogênios em δ 3,34 ($\text{H}_{1''}$) e 5,14 ($\text{H}_{2''}$), e deste último com os hidrogênios em δ 1,76 ($\text{H}_{4''}$, s) e 1,66 ($\text{H}_{5''}$, s), confirmando, desta forma, os dois fragmentos prenils (Subestrutura B).



O espectro de RMN ^{13}C -CPD (75 MHz, CDCl_3 , Figura 38, p. 92) mostrou 26 linhas espectrais. Baseado na teoria do deslocamento químico (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), doze sinais em δ 98.6, 107.7, 114.3, 116.0, 118.9, 122.6, 123.2, 123.9, 124.4, 135.6, 131.0, 143.7, 146.6, 147.3, 156.8 e 160.9, confirmaram a presença de dois sistemas aromáticos, com cinco posições oxigenadas. Foram identificados também três linhas espectrais típicas dos carbonos heterocíclicos de esqueleto tipo pterocarpano, em δ 46,7 (C-6a), 70,6 (C-6) e 83,1(C-11a). Um sinal característico de carbono metílico oxigenado foi observado em δ 61,7, cuja presença foi assegurada pela

correlação com os hidrogênios centrados em δ 3,79 (3H, s) no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, Figura 39, p. 93). Os outros 10 sinais foram compatíveis com a presença de dois fragmentos prenilas.

Através da análise do Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear (HSQC, Figura 39, p. 93), foi possível correlacionar os hidrogênios pertencentes a cada anel aromático aos seus respectivos carbonos (Tabela 12, p. 95).

A posição da metoxila no anel A foi estabelecida pelos acoplamentos observados no espectro de correlação heteronuclear a longa distância (HMBC, Figura 40, p. 94) dos hidrogênios δ 3,79 a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) com o carbono C_3 (δ 146,6). Este espectro exibiu ainda correlações do hidrogênio aromático H_1 (δ 6,95) a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ 123,2 (C-1a) e δ 143,7 (C-2) e dos hidrogênios metilênicos H-1" (δ 3,34) com os carbonos em δ 146,6 (C-3), 116,0 (C-4) e 147,3 (C-4a) que estabeleceram a posição relativa de uma hidroxila no C-2 e de um grupamento prenila no C-4 do anel A, respectivamente.

O pico do íon molecular com m/z 422, observado no espectro de massa de **D93** (EM-IE, Figura 41, p. 96), foi compatível com a estrutura proposta de fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_5$ e o pico base observado em m/z 353 corroborou a presença do substituinte prenila.

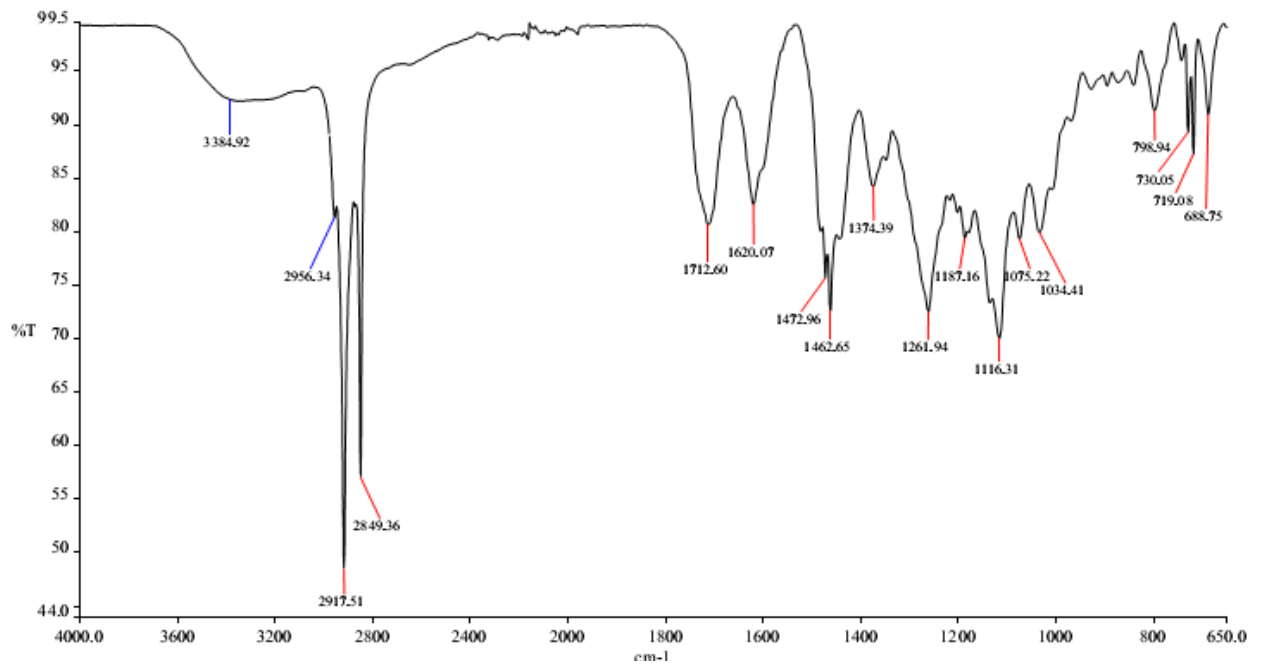
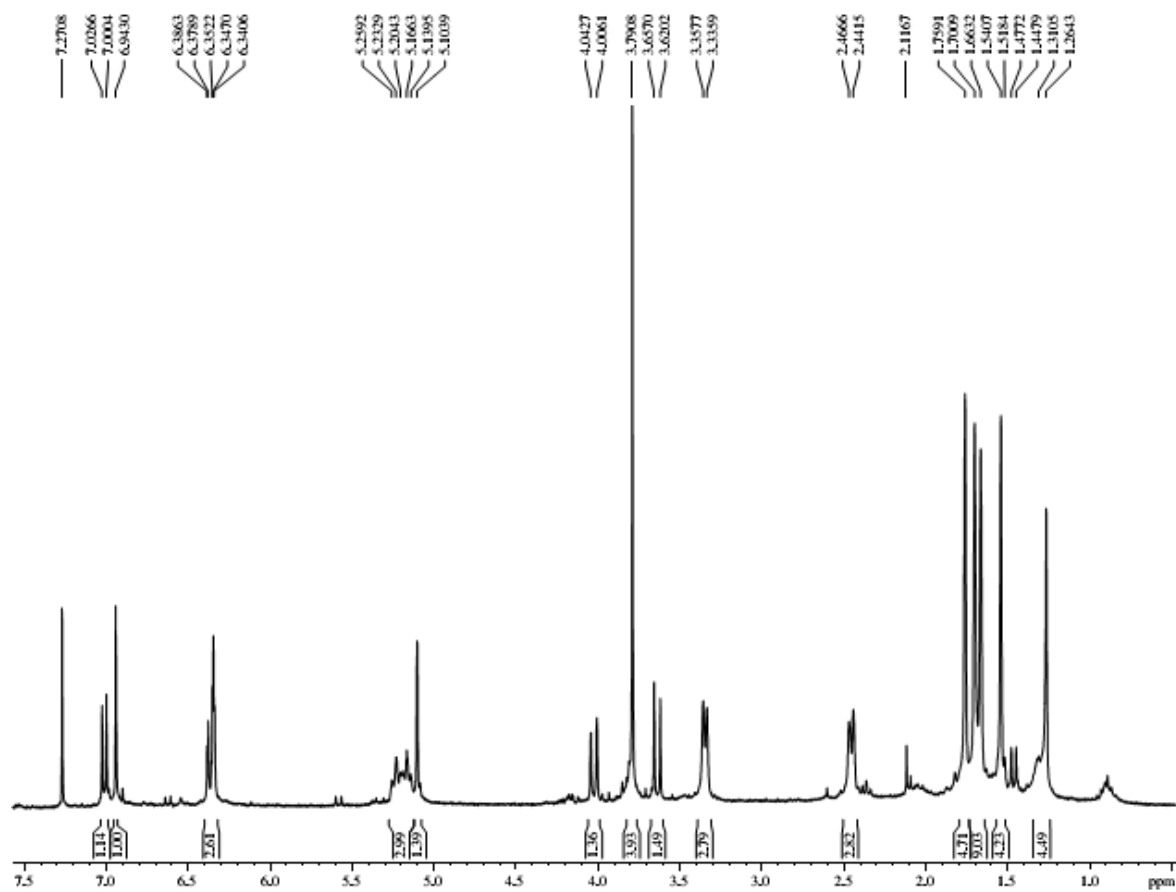


Figura 35. Espectro de absorção na região do infravermelho de **D93**.

Figura 36. Espectro de RMN ^1H de **D93** (300 MHz, CDCl_3).

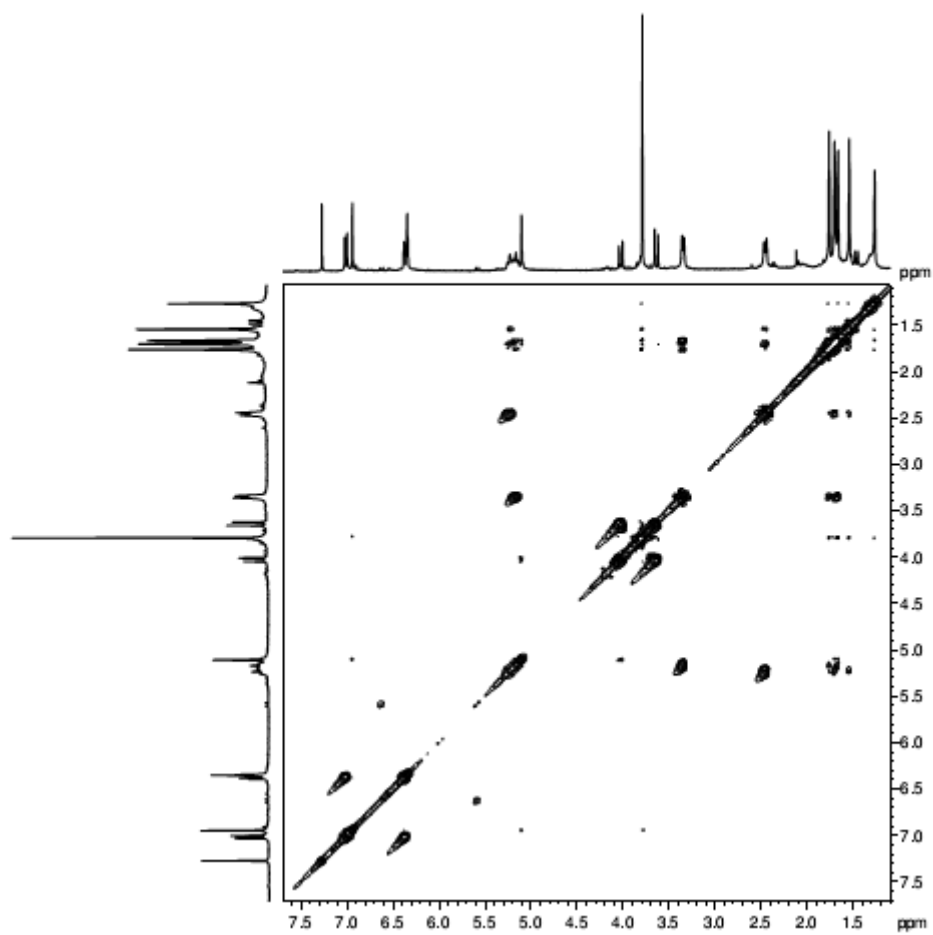


Figura 37. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY de **D93**.

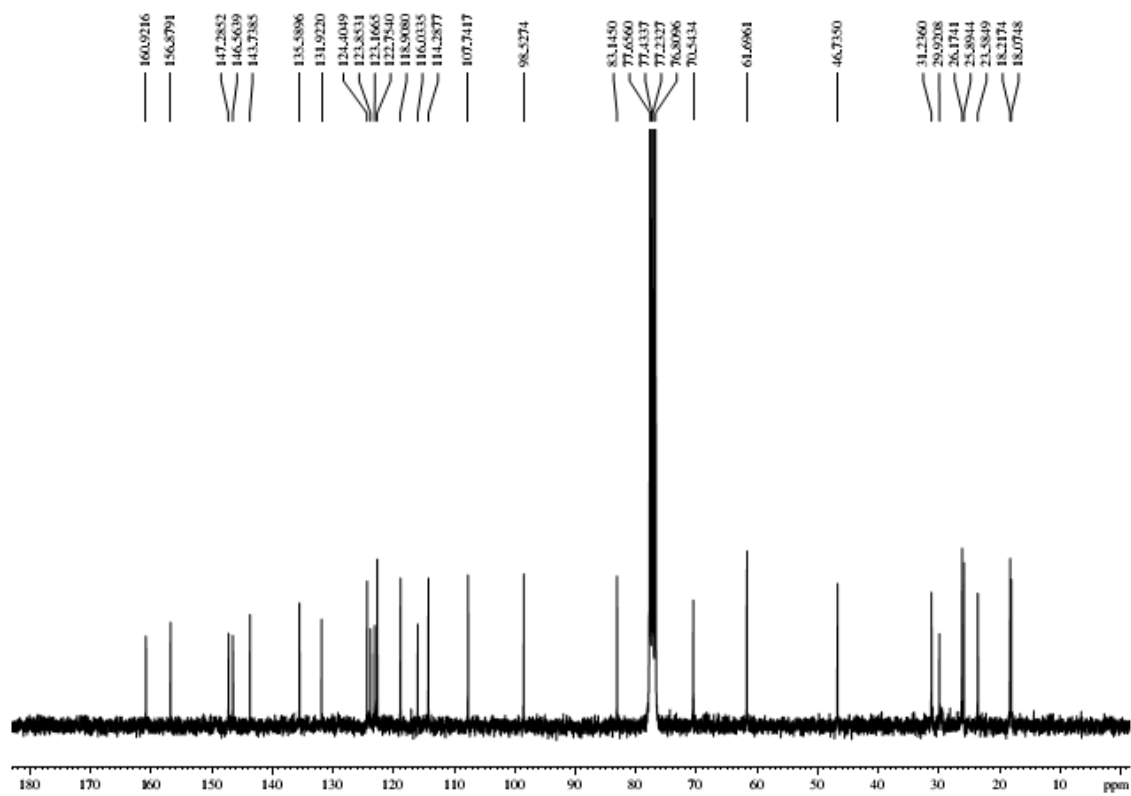


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C -CPD de **D93** (75 MHz, CDCl_3).

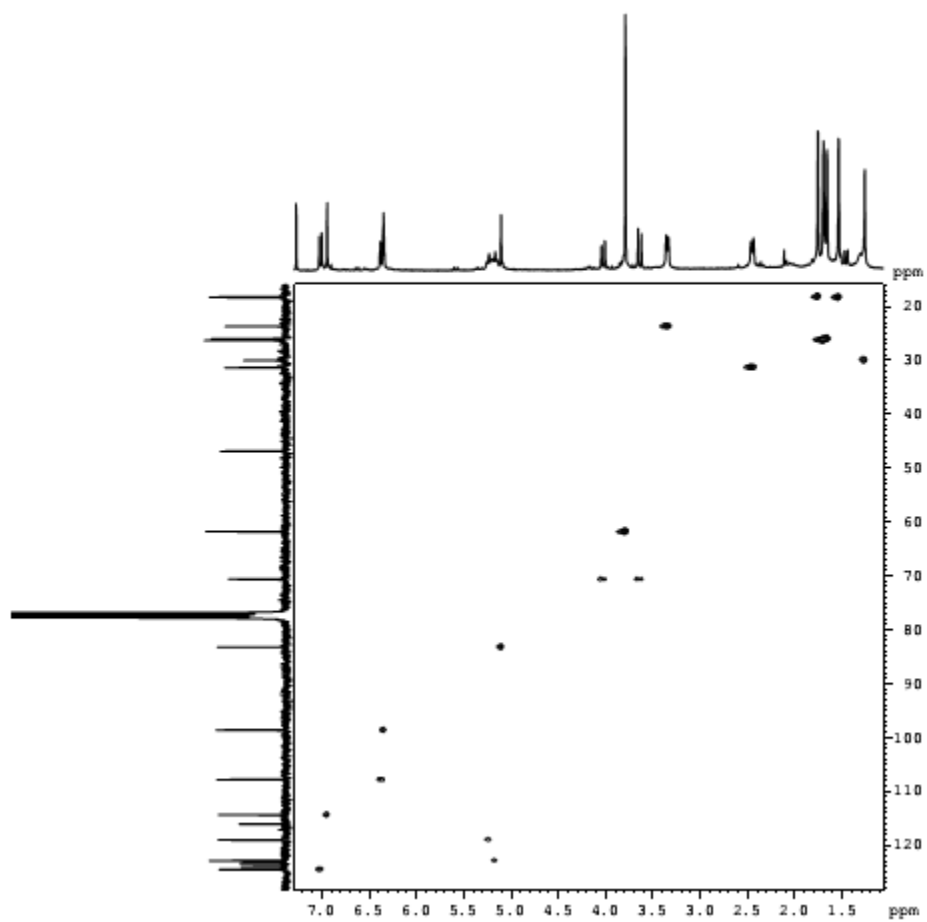


Figura 39. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC de **D93**.

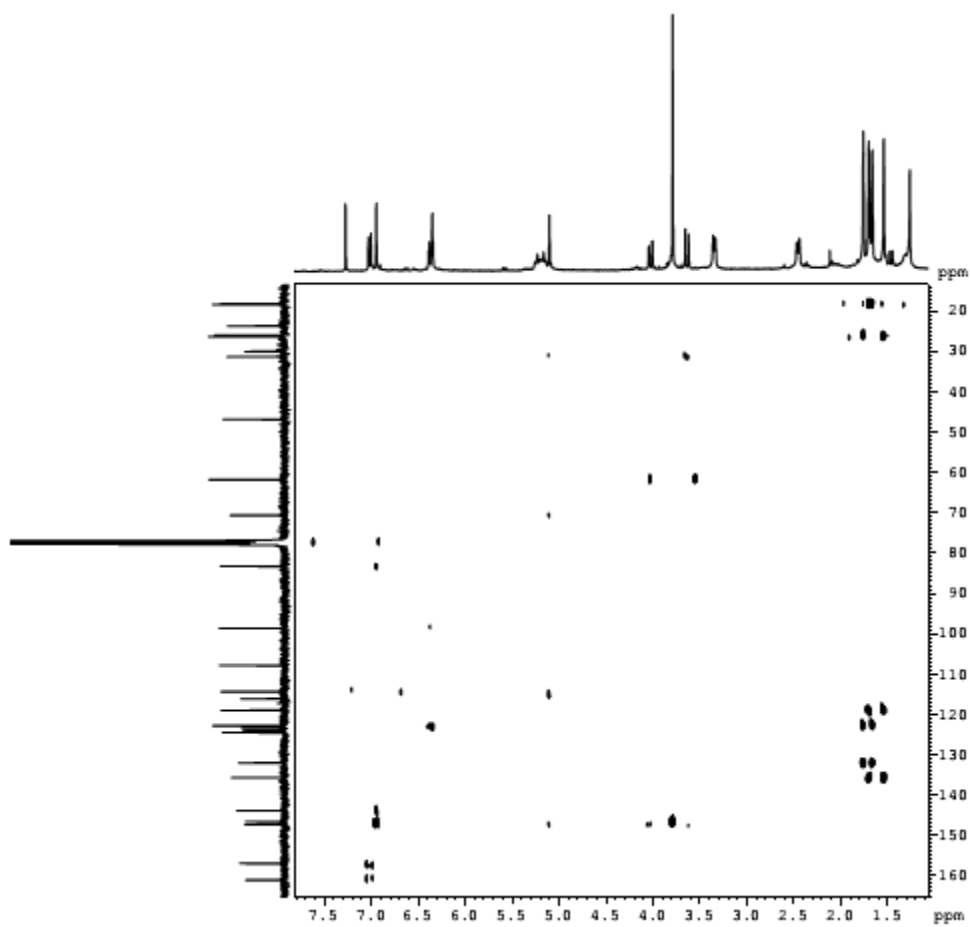


Figura 40. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC de **D93**.

Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de D-93 dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC

Posição	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C				
2	143.74	-		
3	146.56	-		H-1; MeO-3
4	1166.03	-		
4a	147.29	-		H-1; H-11a
6a	46.71	-		
7a	123.85	-		H-8; H-10
9	156.83	-		H-7
10a	160.92	-		H-7; 2H-9
1a	123.16	-		
3'	135.59	-	3H-4'; 3H-5'	
3''	131.02	-	3H-4''; 3H-5''	
CH				
1	114.29	6.95 (s)		H-11 ^a
7	124.41	7.01 (d, 7.9)		
8	107.74	6.36 (dd, 7.9, 2.2)		
10	98.57	6.34 (d, 2.2)		
11a	83.14	5.10 (s)		H-1
2'	118.91	5.23 (t, 7.8)		3H-4'; 3H-5'
2''	122.75	5.14 (t, 6.5)		3H-4''; 3H-5''
CH₂				
6	70.59	4.02 (d, 10.0) 3.64 (d, 10.0)		H-11a
1'	31.24	2.45 (d, 7.5)		H-7a
1''	26.65	3.34 (d, 6.5)		
CH₃				
MeO-3	61.71	3.79 (s)		
4'	18.22	1.54 (s)		3H-5'
5'	26.17	1.70 (s)		3H-4'
4''	18.07	1.76 (s)		3H-5''
5''	25.89	1.66 (s)		3H-4''

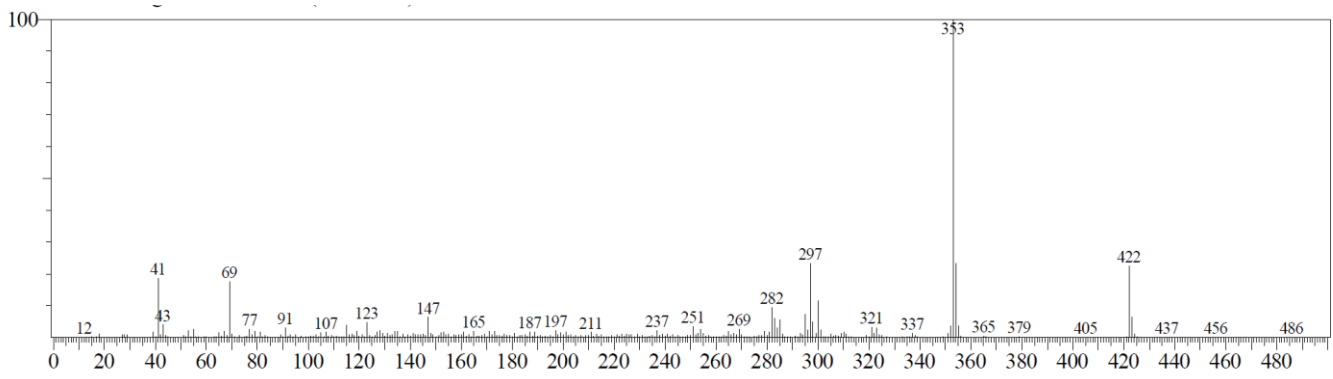


Figura 41. Espectro de massa de baixa resolução de **D93**.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram conhecer a atividade de 26 extratos das espécies da família Fabaceae - *Enterolobium ellipticum* Benth., *Sclerolobium aureum* (Tul.) Baill., *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke, em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, leveduras do gênero *Candida* e dermatófitos do gênero *Trichophyton*.

A espécie *Enterolobium ellipticum* mostrou, em geral, os melhores resultados em *C. parapsilosis* ATCC 22019, onde todos os seus extratos acetato de etila foram ativos com valores de CIM entre 125 e 3,91 µg/mL. Em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, destacou-se o extrato acetato de etila da casca do caule, com CI_{50} de 9,23 µg/mL. A atividade antileishmania e antifúngica de *E. ellipticum* ainda não haviam sido reportadas na literatura.

A espécie *Sclerolobium aureum* demonstrou amplo espectro de atividade de seus extratos acetato de etila e etanólicos da madeira e casca da raiz e do caule. O acetato de etila da madeira da raiz apresentou interessante perspectivas de estudo com valor de CIM de 0,12 e 0,48 µg/mL em *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 10231, respectivamente. E uma atividade em *C. glabrata* LMGO 44 e em *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 09 e *T. rubrum* LMGO 06, com valores de CIM de 31,25 µg/mL. Em *L. (L.) amazonensis*, no entanto, não apresentou atividade.

A espécie *Vatairea macrocarpa*, por sua vez, teve todos seus extratos promissores ($CIM \leq 125$ µg/mL) em pelo menos um dos fungos testados. Essa espécie ainda teve dois dos extratos ativos para *L. (L.) amazonensis*: hexânico da madeira da raiz ($CI_{50} = 72,39$ µg/mL) e acetato de etila da casca da raiz ($CI_{50} = 71,47$ µg/mL). A atividade antileishmania de *V. macrocarpa* ainda não havia sido reportada na literatura.

Considerando a atividade, o rendimento e a polaridade, o extrato acetato de etila da casca da raiz *Vatairea macrocarpa* foi selecionado para o fracionamento químico. O composto **D93** foi isolado, amplamente caracterizado e nomeado pelo nosso grupo de pesquisa de **vatacarpina**, sendo inédito na

literatura. O composto dianellidina (**D3**), descrito na literatura, também foi obtido. Já os compostos **D5** e **D94** estão em fase de identificação.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar o fracionamento e a caracterização química do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum*, que obteve CI_{50} de 9,23 $\mu\text{g/mL}$ em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- Continuar o estudo da espécie *Sclerolobium aureum* em fungos patógenos humanos
- Avaliar a atividade dos compostos isolados de *Vatairea macrocarpa* - inédito **D93 (vatacarpina)** e conhecidos **D3**, **D5** e a mistura de pterocarpano **D94** - em fungos patogênicos humanos e em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- Analisar a toxicidade dos compostos em linhagens de células de mamíferos

7 REFERÊNCIAS

ALBERNAZ, L.C.; de PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**. 131: 116–121. 2010.

ARAUJO, R.M.; PINHEIRO, S.M.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Complete NMR data assignments for novel pterocarpanes from *Harpalyce brasiliiana*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. 46: 890-893. 2008.

ALENCAR, M.N.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S. C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 35: 1674–1681. 2003.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**. 35: 699–705. 2010.

ASSCHE, T.V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R.A. I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**. 51: 337–351. 2011.

BAVILONI, P.D.; DOS SANTOS, M.P.; AIKO, G.M.; REIS, S.R.; LATORRACA, M.Q.; DA SILVA, V.C.; DALL'OGGIO, E.L.; DE SOUSA, P.T. Jr.; LOPES, C.F.; BAVIERA, A.M.; KAWASHITA, N.H. Mechanism of anti-hyperglycemic action of *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae): investigation in peripheral tissues. **Journal of Ethnopharmacology**. 131(1):135-139. 2010.

BEDNAREK, P.; OSBOURN, A. Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. **Science**. 324: 746-747. 2009.

BRAMMER, K.W.; FARROW, P.R.; FAULKNER, J.K. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. **Reviews of Infectious Diseases**. 12 (3): 318–326. 1990.

BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, A.M.; REDO, D.; XU, Z.; GANESH, S. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado): 1986-2002. Comparative analysis and implications for land-use policy. **Land use Policy**. 25 (4): 579-595. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília. 2ª edição. 182 p. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana (Diagnóstico Clínico e Diferencial)**. Brasília. 1ª edição. 138 p. 2006.

CAPPELLETY, D.; EISELSTEIN-MCKITRICK, K. The echinocandins. **Pharmacotherapy**. 27 (3): 369–388. 2007.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. D.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* DUKE. **Phytochemistry**. 49: (675-680). 1998.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 66: 457–465. 2011

CHAZALET, M. S.; THOMAS, C.; DUPEYRAT, M.; GARY-BOBO, C. M. Ampho-tericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidyl-choline: a monolayer study. **Biochimica et Biophysica Acta**. 944. 477–486. 1988.

CHOI, G.J.; LEE, SW; JANG, K.S.; KIM, J.S.; CHO, K.Y.; KIM, JC. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. **Crop Protection**. 23: 1215–1221. 2004.

COELHO, F.B.R; DAL BELO, C.A.; LOLIS, S.F.; SANTOS, M.G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 2 (2): 52-55. 2005.

COOPOOSAMY, R.M.; MAGWA, M.L. Antibacterial activity of chrysophanol isolated from *Aloe excelsa* (Berger). **African Journal of Biotechnology**. 5: 1508-1510. 2006.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1926-1978, v. III, p. 41; v. VI, p. 254.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Document M27-A2, NCCLS, Pennsylvania 17: 1-39, 2002.

CSLI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, Second Edition. Document M38-A2. 2008.

de MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; de PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. 110: 165–170. 2007.

DENNING, D.W. Echinocandins: a new class of antifungal. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 49 (6): 889–891. 2002.

DIAS, D.A.; SILVA, C.A.; URBAN, S. Naphthalene Aglycones and Glycosides from the Australian Medicinal Plant, *Dianella callicarpa*. **Planta Medicinal**. 75: 1442–1447. 2009.

DURAIKANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. S204-S215. 2011.

ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS Jr. J.R.; de MESQUITA, M.L.; MARQUIÉ, P.; de PAULA, J.E.; MAMBU, L.; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**. 70: 1093–1095. 2004.

FARIAS, D.F.; CAVALHEIRO, M.G.; VIANA, M.P.; QUEIROZ, V.A.; ROCHA-BEZERRA, L.C.B.; VASCONCELOS, I.M.; MORAIS, S.M.; CARVALHO, A.F.U. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 82(3): 585-59. 2010.

FORMIGA, M.D.; GOTTLIEB, O.R. ; MENDES, P.H.; KOKETSU, M.; ALMEITA, M. E.; PEREIRA, M. O. S.; MAGALHAES, M.T. Constituents of Brazilian Leguminosae. **Phytochemistry**. 14: 828-830. 1975.

GARCIA-ROSA, K.; VILLARREAL-ALVAREZ, N.; LUBBEN, P.; PENA-RODRIGUEZ, L.M. Chrysophanol, an antimicrobial anthraquinone from the root extract of *Colubrina greggii*. **Journal Mexican Chemistry Society**. 50: 76-78. 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de metabólitos Secundários. **Química Nova**. 30 (2): 374-381. 2007.

GRANNOUM, M.A.; LONG, L.; CIRINO, A.J.; MILLER, A.R.; NAJAFI, R.; WANG, L.; SHARMA, K.; ANDERSON, M.; MEMARZADEH, B. Efficacy of NVC-422 in the treatment of dermatophytosis caused by *Tricophyton*

mentagrophytes using a guinea pig model. **International Journal of Dermatology**. 52: 567-571. 2013.

HAVLICKOV, B.; CZAIIKA, V.A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**. 51: 2-15. 2008.

HECTOR, R.F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**. 6 (1): 1–21. 1993.

IANAS, V.; MATTHIAS, K.R.; KLOTZ, S.A. Role of posaconazole in the treatment of oropharyngeal candidiasis. **Infection and Drug Resistance**. 3: 45–51. 2010.

IBGE, 2004. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br>>. Acesso em: 03/04/2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOCIÊNCIAS E ESTATÍSTICA. IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 08/06/12.

ISLAM, M.K.; SOHRAB, M.D.; JABBAR, A. Caffeine and p-Anisaldehyde from the fruits Of *Enterolobium saman* Prain. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 3(1): 168-170. 2012.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, D. T. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19 (1A): 130-139. 2009.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**. 26: 225.e1–225.e10. 2011.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. D. Amphotericin B and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Isolates

Recovered from a Critically Ill Patient. **Clinical Infectious Diseases**. 42: 938–944. 2006.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 68(2) 151–162. 2005.

LI, X.; MCLAUGHLI, J.L. Bioactive compounds from the root of *Myrszne Africana*. **Journal of Natural Products**. 52 (3): 660-662. 1989.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**. 10 (1): 1–10. 2004.

MATOS, F.J.A.; AGUIAR, L.M.B. A.; SILVA, M.G.V. **Acta Amazonica**. 18 (1-2): 351-352. 1988.

MELO E SILVA, F.M.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**. 52: 511–517. 2009.

MCCALL, L.; ZHANG, W.; RANASINGHE, S.; MATLASHEWSKI, G. Leishmanization revisited: Immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. **Vaccine**. 31: 1420-1425. 2013.

MIMAKI, Y.; HARADA, H.; SAKUMA, C.; HARAGUCHI, M.; YUI, S.; KUDO, T.; YAMAZAKI, M.; SASHIDA, Y. Contortisiliosides A-G: Isolation of Seven New Triterpene Bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and their Cytotoxic Activity. **Helvetica Chimica Acta**. 87: 851-865. 2004.

MINNEBRUGGEN, G.V.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K.; VROOME, V.; BORGERS, M.; SHROOT, B. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**. 4: 22-32. 2010.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 63: 309-322. 2010.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, AL.; McDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are really spending? **Plos Medicine**. 137-146. 2009.

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

MUBARAKA, S.A.; ROBERT, A.A.; BASKARADOSS, J.K.; AL-ZOMAN, K.; SOHAIL, A.A.; ALSUWYED, A.; CIANCIO, S. The prevalence of oral *Candida* infections in periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Infection and Public Health**. 2013.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J.A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**. 69: 127 – 137. 2000.

NEOFYTOS, D.; LU, K.; HATFIELD-SEUNG, A.; BLACKFORD, B.; MARR, K.A.; TREADWAY, S.; OSTRANDER, D.; NUSSENBLATT, V.; KARP, J. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 75: 144–149. 2013.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta botanica**. 17(4): 561-584. 2003.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W. A. In: ____ **Parasitologia humana**. 11^a edição. Atheneu, 2005. Cap. 41, p. 41-46.

OLIVEIRA, H. C.; SANTOS, M. P.; GRIGULO, R.; LIMA, L. L.; MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. C. S.; STOPPIGLIA, L. F.; LOPES, C. F.; KAWASHITA, N. H. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 115: 515–519. 2008.

OLIVEIRA, H. C.; SANTOS, M. P.; GRIGULO, R.; LIMA, L. L.; MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. C. S.; STOPPIGLIA, L. F.; LOPES, C. F.; KAWASHITA, N. H. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 115: 515–519. 2008.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHIA, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**. 118: 87–96. 2011.

PALOMBO, E.A.; SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 77: 151–157. 2001

PATHAK D.; YADAVA M.; SIDDIQUI N.; KUSHAWAH S. Antileishmanial Agents: An Updated Review. **Der Pharma Chemica**. 3(1): 239-249. 2011.

PERSON, A.K.; KONTOYIANNIS, D.P.; ALEXANDER, B.D. Fungal Infections in Transplant and Oncology Patients. **Hematology/Oncology Clinical of North American**. 25: 193–213. 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**. 125: S3-S13. 2012

PIEIDADE, L.F.; FILHO, W.W. Antraquinonas de *Vatairea guianensis* AUBI (FABACEAE). **Acta Amazonica**. 18 (3-4): 185-187. 1988.

POTOSKI, B.A.; BROWN, J. The safety of voriconazole. **Clinical Infectious Diseases**. 35 (10): 1273–1275. 2002.

POUND, M.W.; TOWNSEND M.L.; DIMONDI, V.; WILSON, D.; DREW, R.H. Overview of treatment options for invasive fungal infections. **Medical Mycology**. 49: 561-580. 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; DE JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. 26 (4): 550-555. 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**. 7: 581–96. 2007.

RICHARD J.V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**. 14: 447–455. 2010.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**. 111: 295–302. 2007.

RODRIGUES, A.M.S.; de PAULA, J.E.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of *Cydistax antisiphilitica* against larvae. **Fitoterapia**. 76: 755–757. 2005.

ROEMER, T.; XU, D.; SINGH, S.B.; PARISH, C.A.; HARRIS, G.; WANG, H.; DAVIES, J.E.; BILLS, G.F. Confronting the Challenges of Natural Product-Based Antifungal Discovery. **Chemistry & Biology**. 18: 148-164. 2011.

SAFDAR, A.; JONATHAN, M.A.; SALIBA, F.; DUPONT, B.; WINGARD, J.R.; HACHEM, R.Y.; MATTIUZZI, G.N.; CHANDRASEKAR, P.H.; KONTOYIANNIS, D.P.; ROLSTON, K.V.; WALSH, T.J.; CHAMPLIN, R.E.; RAAD, I.I. Drug-

Induced Nephrotoxicity Caused by Amphotericin B Lipid Complex and Liposomal Amphotericin B. **Medicine**. 89 (4): 236-244. 2010.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**. 11: 1668–1679. 2011.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 20 (9): 462–479. 2002.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**. 5: 31-39. 2011.

SHAHAT, A.A.; EL-BAROUTY, G.; HASSAN, R.A.; HAMMOUDA, F.M.; ABDEL-RAHMAN, F.; SALEH, M.A. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). **Journal of Environmental Science and Health**. 43: 519–525. 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7ª Ed., Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2007.

SOUZA, T.M.; FARIAS, D.F.; SOARES, B.M.; VIANA, M.P.; LIMA, G.P.G.; MACHADO, L.K.A.; MORAIS, S.M.; CARVALHO, A.F.U. Toxicity of brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget animals. **Journal of Medical Entomology**. 48(4):846-851. 2011.

TASSEL, D.; MADOFF, M. A. Treatment of *Candida* sepsis and *Cryptococcus* meningitis with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent. **Journal of the American Medical Association**. 206 (4). 830–832. 1968.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**. 15: e525–e532. 2011.

TOLEDO, C.E.M.; BRITTA, E.A.; CEOLE, L.F.; SILVA, E.R.; DE MELLO, J.C.P.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**. 133: 420–425. 2011.

TSAI, PW; CHEN, YT; HSU, PC; LAN, CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. **BioMedicine**. 3: 51-64. 2013.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**. 1-26: 2012.

WALDORFF, A.R.; POLAK, A. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 23 (1). 79–85. 1983.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 78: 193-200. 2001.

ZHOU, X.; SONG, B.; JIN, L.; HU, D.; DIAO, C.; XU, G.; ZOU, Z.; YANG, S. Isolation and inhibitory activity against ERK phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. 16: 563-568. 2006.