

ELLEN TANUS RANGEL

Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de
extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em
Leishmania (Leishmania) chagasi

BRASÍLIA

2010



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ELLEN TANUS RANGEL

Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de
extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em
Leishmania (Leishmania) chagasi

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Orientador: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espíndola

BRASÍLIA

2010

ELLEN TANUS RANGEL

Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de
extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em
Leishmania (Leishmania) chagasi

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espíndola
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Eloísa Dutra Caldas
Examinadora

Prof. Dr. Pedro Sadi Monteiro
Examinador

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero
Examinador

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Examinador

Prof^a. Dr^a. Mariana Laundry de Mesquita
Suplente

Dedico esse trabalho a todos que, como eu acreditam na pesquisa científica, no aprendizado e na educação como forma de mudar o mundo.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Laila Salmen Espíndola Darvenne pela paciência e grande oportunidade de aprendizado.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula pela participação fundamental nas coletas e identificação das espécies vegetais do Cerrado, e pelo convívio alegre e estimulante nas coletas de campo.

Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pela cooperação e acolhimento do nosso grupo sempre que preciso, pela participação nas leituras das lâminas e pela colaboração valiosa na qualificação dessa tese.

Ao Prof. Dr. Jaime Santana por sua colaboração na doação da cepa de *T. cruzi* e outras contribuições ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Romero pela atenção dispensada sempre que solicitada, pela parceria de trabalho e pela participação na banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Pedro Sadi pelos conselhos e sugestões e pela participação na banca de qualificação e defesa.

A Prof^ª. Dr^ª. Eloisa Caldas por aceitar participar da banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Valdir da Veiga Junior por aceitar participar da banca de defesa.

A Prof^ª. Dr^ª. Vânia Ferreira pelas contribuições prestadas na banca de qualificação que enriqueceram esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e Prof^ª Dr^ª. Renata Araújo do CENAU-REMUN, Universidade Federal do Ceará pela contribuição no estudo químico de extratos vegetais.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e a todos os professores que contribuíram na construção do meu conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da UnB que passaram pela minha vida e deixaram algum tipo de contribuição: Rubens, Renata, Fernanda, Thiago, Jair, Clarice, Alice, Karla e André pelo trabalho em equipe, amizade e companheirismo.

Aos amigos que conquistei ao longo dessa jornada: Nashira, Dani, Lorena, Aline, Mariana, e Everton obrigada por toda a contribuição científica, mas também por se tornarem amigos de verdade que vou levar para toda a vida.

Ao meu amor Luís Eduardo, por ser meu companheiro em todos os momentos, os de alegrias e dificuldades, pelo seu amor incondicional, seu apoio e compreensão. Te amo!

A minha filha Maria Luísa que mesmo sem saber e ainda no ventre me proporcionou nesses últimos dias uma tranquilidade e determinação para ir até o fim.

Aos meus sobrinhos queridos Miguel e Rafael, que sempre nos dias mais estressantes estavam lá com toda a animação para mostrar que tudo é possível.

Aos meus pais, irmã e cunhado, pelo carinho, pela paciência, pelas conversas, pelo amor e por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos do Mato Grosso que sempre que puderam estiveram presentes nessa longa jornada: Iberê, Luciana e Scheila pela amizade e apoio.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Farmacognosia, Thati, Ênio, Carol, Pollyana, Jéssica, Hugo, João, Camila e Renata pela troca de informações e aprendizagem conjunta.

Aos queridos amigos Juliano, Giovana e Carlos que me apoiaram e me ajudaram com a amizade e o companheirismo principalmente nos momentos mais difíceis do trabalho.

A minha melhor amiga Tatiana que sempre esteve ao meu lado em TODOS os momentos da minha vida.

A minha amiga e chefe Nádia que sempre me apoiou em todos os momentos.

A você Tio Paulo meu sogro querido, por ser esta pessoa maravilhosa com quem sempre posso contar.

As amigas: Débora e Letícia que sempre me apoiaram nesta fase final.

Aos funcionários do Biotério FS/FM, pelo apoio com os animais de laboratório sempre que necessário.

Aos técnicos administrativos da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, em especial a Edigres (Grace) pelo convívio e atenção sempre que solicitado.

Ao Laboratório de Micologia de Goiânia em especial a Prof^a Maria do Rosário pela colaboração em doar os fungos para os testes.

Ao animal de laboratório, que com sua vida ajudou a realizar esse trabalho, colaborando com o desenvolvimento da ciência.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para a execução desse trabalho.

RESUMO

Um total de 120 extratos oriundos de 26 espécies pertencentes a 16 famílias de plantas do bioma Cerrado foi avaliado *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania* ssp. e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Através dessa triagem foram selecionados 14 extratos ativos, que foram testados em formas amastigotas de *Leishmania* ssp. e em leveduras *Candida* ssp. e *Cryptococcus* ssp. A toxicidade em células NIH-3T3 de fibroblastos de mamífero permitiu verificar a especificidade de ação desses extratos. Os resultados obtidos neste estudo permitiram selecionar o extrato hexânico da folha de *Siparuna cujabana* (Siparunaceae), com valor de IC₅₀ de 8,75 µg/mL para amastigotas *L. (L.) amazonensis*, não demonstrando ser tóxico às células de mamífero com valor de IC₅₀ de 378,55 µg/mL para NIH-3T3, apresentando assim índice de seletividade (IS) de 43,2. Esse extrato também foi ativo em *Candida albicans* ATCC 10231, com valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 31,25 µg/mL, *Candida krusei* LMGO 174, com CIM de 62,5 µg/mL e em *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, ambos com CIM de 31,25 µg/mL. Assim, o extrato hexânico da folha de *S. cujabana* foi avaliado *in vivo* em camundongos Balb-c infectados com *L. (L.) chagasi*, na dose de 100 e 250 mg/Kg. Observou-se o percentual de inibição dose-dependente de 52,5% para a menor dose e de 71,2% para a maior. A miltefosina, medicamento referência na dose de 40 mg/Kg, apresentou 81,6% de inibição. A espécie *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) também destacou-se pela sua importante atividade. Para as formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, o extrato diclorometânico do rizoma desta planta apresentou IC₅₀ de 6,03 e 11,58 µg/mL. Para as células de mamíferos, esse extrato apresentou IC₅₀ de 235,38 µg/mL, com índice de seletividade de 39 para *L. (L.) chagasi*. Este extrato apresentou ainda atividade para as formas epimastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ = 50 µg/mL), atividade próxima ao Benznidazol (IC₅₀ = 46 µg/mL), medicamento referência do teste, e utilizado para o tratamento da doença de Chagas. O extrato diclorometânico do rizoma de *R. alpinia* foi ativo em leveduras: *Candida krusei* LMGO 174 (CIM de 31,5 µg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* LMGO 44 (ambos com CIM de 125 µg/mL) e em *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (CIM de 31,5 µg/mL) e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (CIM de 7,81 µg/mL). O fracionamento cromatográfico biomonitorado do extrato hexânico da folha de *S. cujabana* e do extrato diclorometânico do rizoma de *R. alpinia* está sendo feito, **com a perspectiva de** identificação e desenvolvimento de compostos líderes para o tratamento da leishmaniose.

Palavras chave: *Leishmania*; fungos; citotoxicidade; Cerrado; extratos de plantas, *Siparuna cujabana*; *Renealmia alpinia*.

ABSTRACT

A hundred twenty extracts from 26 species belonging to 16 families of Brazilian Cerrado plants were evaluated *in vitro* against promastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *L. (L.) amazonensis*, and epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Through this screening, we selected 14 active extracts, which were tested against amastigotes of *Leishmania* ssp, yeast *Candida* ssp. and *Cryptococcus* ssp. Toxicity tests against mammalian fibroblasts NIH-3T3 cells showed the specificity of action of these extracts. The results of this study showed that the hexane extract of *Siparuna cujabana* (Siparunaceae) leaf, with IC₅₀ value of 8.75 µg/mL against amastigotes of *L. (L.) amazonensis*, was not proven to be toxic to mammalian cells with IC₅₀ of 378.55 µg/mL against NIH-3T3, thus presenting a selectivity index (SI) of 43.2. The extract was also active against *Candida albicans* ATCC 10231, with the minimum inhibitory concentration (MIC) value of 31.25 µg/mL; against *Candida krusei* LMGO 174, with MIC of 62.5 µg/mL; and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, both with MIC of 31.25 µg/mL. The hexane extract of the *S. cujabana* leaf was evaluated *in vivo* against Balb-c mice infected with *L. (L.) chagasi*, at a dose of 100 and 250 mg/kg. It was observed that the percentage of dose-dependent inhibition of 52.5% for the lower dose and 71.2% for the higher. The miltefosine, reference drug at a dose of 40 mg/kg, showed 81.6% inhibition. The species *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) also stood out for its important activity. For the amastigotes of *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis* the dichloromethane extract of the rhizome of this plant showed IC₅₀ of 6.03 and 11.58 µg/mL. For mammalian cells, this extract showed IC₅₀ of 235.38 µg/mL, with a selectivity index of 39 for *L. (L.) chagasi*. This extract also showed activity against the epimastigotes of *T. cruzi* (IC₅₀ = 50 µg/mL), activity near the benznidazole (IC₅₀ = 46 µg/mL), the reference drug test, and used for the treatment of Chagas disease. The dichloromethane extract of the rhizome of *R. alpinia* was active against the yeast: *Candida krusei* LMGO 174 (MIC of 31.5 µg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. glabrata* LMGO 44 (both with MIC of 125 µg/mL) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (MIC of 31.5 µg/mL) and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (MIC of 7.81 µg/mL). The bioassay-guided fractionation of hexane extract of the leaf of *S. cujabana* and dichloromethane extract of the rhizome of *R. alpinia* is being done, with the prospect of identifying and developing leading compounds for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*; fungi; cytotoxicity; Cerrado; plant extracts; *Siparuna cujabana*; *Renealmia alpinia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa dos biomas brasileiros mostrando a área central (na cor laranja) do Cerrado e as áreas de Cerrado inseridas nos outros biomas	21
2	Mapa que demonstra a área de distribuição original do Cerrado resultante da classificação das imagens do satélite MODIS	22
3	Mapa resultante da classificação das imagens do satélite MODIS mostrando as áreas desmatadas na parte central do Cerrado e os principais blocos remanescentes de vegetação nativa	22
4	Vista geral do tipo de vegetação florestal denominada Mata ciliar. Na imagem se destaca a espécie <i>Tabebuia avellanedae</i> conhecido como ipê roxo	23
5	Vista Geral do tipo de vegetação florestal denominada Mata de galeria	24
6	Vista Geral do tipo de vegetação florestal denominada Mata Seca	24
7	Vista geral do tipo de vegetação florestal denominada Cerradão	25
8	Vista geral do tipo de vegetação denominada Cerrado <i>stricto sensu</i>	26
9	Vista geral do tipo de vegetação denominada Parque de Cerrado com a presença dos murundus	27
10	Vista geral do tipo de vegetação denominada Vereda	27
11	Vista geral do tipo de vegetação campestre denominada Campo Sujo	28
12	Vista geral do tipo de vegetação campestre denominada Campo Rupestre	29
13	Vista geral do tipo de vegetação campestre denominada Campo Limpo	29
14	Distribuição geográfica da família Siparunaceae em vermelho	30
15	Aspecto das folhas de <i>Siparuna</i> ssp. – Família Siparunaceae	31
16	Aspecto da flor de <i>Siparuna</i> ssp. – Família Siparunaceae	32
17	Aspecto dos frutos de <i>Siparuna</i> ssp. – Família Siparunaceae	32
18	Distribuição mundial da leishmaniose	36
19	Leishmaniose cutânea (LC)	37
20	Leishmaniose cutânea difusa (LCD)	38
21	Leishmaniose mucocutânea (LMC)	38

22	Leishmaniose Visceral (LV)	38
23	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , vetor da leishmaniose	40
24	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> ssp.	41
25	O mapa mostra a distribuição global dos casos reportados de co-infecção <i>Leishmania</i> ssp./ HIV e a distribuição dos casos de leishmaniose	42
26	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
27	Esquema da metodologia de preparo dos extratos vegetais.	52/53
28	Meio de cultura sólido, McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN)	54
29	Câmara de Neubauer	55
30	Camundongos C57BL/6	55
31	Camundongos Balb/c	56
32	Esquema da diluição seriada	59
33	Retirada dos macrófagos peritoneais (a) e recolhidos em tubos falcon (b).	62
34	Placa de 24 poços com as lamínulas já coradas (a) as lamínulas montadas em lâmina de vidro (b).	63
35	Injeção intraperitoneal do inóculo <i>L. (L.) chagasi</i>	66
36	Administração oral (gavagem orogástrica) dos tratamentos com extrato	67
37	Necropsia para retirada do baço e fígado dos animais tratados.	68
38	Cromatografia em coluna aberta (a) e Cromatografia em camada delgada (b).	69
39	Fluxograma geral da ordem dos experimentos e a tomada de decisões.	73
40	Efeito do extrato hexânico das folhas de <i>S. cujabana</i> em camundongos Balb-c infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> . Efeito da administração oral do veículo, extrato hexânico das folhas de <i>S. cujabana</i> nas doses de 100 mg/Kg e 250 mg/Kg e o medicamento referência, Miltefosina 40 mg/kg. Cada coluna representa a média de 5 animais por grupo. As linhas verticais representam o E.P.M. ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls ** p < 0,01; *** p < 0,001 em comparação ao grupo veículo.	90
41	Cromatografia recaptulativa dos 13 subgrupos obtidos após fracionamento da subfração ciclohexano, da fração acetato de etila, obtido do grupo G8 de <i>S. cujabana</i> . Eluente da placa: ciclohexano:	95

acetato de etila (75:25). Revelador: vanilina sulfúrica.

42	Cromatograma dos subgrupos (SG2 a SG8) reunidos obtidos após fracionamento da subfração ciclohexano, oriundo da subfração acetato de etila, obtido do grupo G8 de <i>S. cujabana</i> . O cromatograma foi obtido por HPLC, em coluna X-Terra, operando em modo normal, utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (70:30) em fluxo 4,72 mL/min.	97
43	Molécula do β -sitosterol.	98
44	Cromatografia recaptulativa dos 16 subgrupos da coluna de purificação, após fracionamento da fração clorofórmica do G12. Eluente da placa: Ciclohexano: Acetato de etila (75:25). Revelador: vanilina sulfúrica.	100
45	Cromatograma dos subgrupos obtidos após fracionamento do subgrupo clorofórmico oriundo do grupo G12 obtido pelo fracionamento de <i>Siparuna cujabana</i> analisados em HPLC, em coluna X-Terra, operando em modo normal, utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (80:20) em fluxo 4,72 mL/min.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Leishmanioses do Novo Mundo e seus agentes etiológicos.	37
2	Espécies de plantas coletadas no bioma Cerrado.	51
3	Extratos de plantas do bioma Cerrado avaliados em <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , <i>Leishmania (L.) chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .	74
4	Atividade <i>in vitro</i> (IC ₅₀) de extratos de plantas em promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	76
5	Atividade <i>in vitro</i> (IC ₅₀) de extratos de plantas em amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> e citotoxicidade em células NIH-3T3.	78
6	Atividade <i>in vitro</i> da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de plantas em <i>Candida</i> ssp. e <i>Cryptococcus</i> ssp.	80

7	Efeitos da administração oral do extrato hexânico da folha de <i>S. cujabana</i> sobre as atividades comportamentais gerais, em camundongos.	88
8	Atividade dos grupos oriundo do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folha de <i>Siparuna cujabana</i> em <i>L. (L.) chagasi</i> à 100 µg/mL e o valor de IC ₅₀ em µg/mL.	93
9	Atividade das frações oriundas do fracionamento cromatográfico dos grupos ativos G8, G9, G10 e G12 do extrato hexânico de folha de <i>Siparuna cujabana</i> sobre <i>L. (L.) chagasi</i> à 100 µg/mL e o valor de IC ₅₀ em µg/mL.	94
10	Atividade das subfrações obtidas após fracionamento da fração acetato de etila oriundo do grupo G8 obtido pelo fracionamento do extrato hexânico da folha de <i>S. cujabana</i> em <i>L. (L.) chagasi</i> à 100 µg/mL e o valor de IC ₅₀ em µg/mL.	94
11	Atividade dos subgrupos obtidos após fracionamento da subfração ciclohexano oriunda da fração acetato de etila, obtido do grupo G8 de <i>S. cujabana</i> em <i>L. (L.) chagasi</i> a 100 µg/mL.	96
12	Atividade dos subgrupos obtidos após fracionamento da fração clorofórmica oriundo do grupo G12 obtido pelo fracionamento de <i>Siparuna cujabana</i> em <i>L. (L.) chagasi</i> a 100 µg/mL.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
a	Acetato de etila
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Linhagem de camundongos
C	Caule (madeira + casca)
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C.g.</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C.k.</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C.g.</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>

<i>C.n.</i>	<i>Espécies do Complexo Cryptococcus neoformans</i>
<i>C.p.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
Cc	Coluna cromatográfica
CC	Casca do caule
CCD	Cromatografia em camada delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE/HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COSY	Correlated spectroscopy
d	Diclorometano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
e	Etanol
EPM	Erro padrão da média
F	Folhas
FM	Faculdade de Medicina
Fr	Frutos
FS	Faculdade de Ciências da Saúde
h	Hexano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	índice de concentração inibitória capaz de matar 50% dos parasitos
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa

LIT	Liver Infusion Tryptose
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LMGO	Laboratório de Micologia de Goiás
LV	Leishmaniose visceral
MC	Madeira do caule
MODIS	Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer
MOPS	3-n norpholino propanesulfonic acid
MTT	3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5 diphenyl tetrazolium bromide
NIH-3T3	Linhagem de fibroblastos
NNN	McNeal, Novy e Nicolle
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	Meio desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
Rz	Rizoma
SDS	Sulfato dodecil de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SI	Índice de seletividade
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
UB	Herbário da Universidade de Brasília
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UnB	Universidade de Brasília
v.o.	Via oral
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

		Página
1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Plantas Medicinais	20
2.2	Cerrado	20
2.2.1	Formações Florestais no Cerrado	23
2.2.2	Formações Típicas de Cerrado	25

2.2.3	Formações Campestres	28
2.3	Espécie do bioma Cerrado relevante para o estudo	30
2.4	Leishmaniose	35
2.5	Doença de Chagas	46
2.6	Infecções Fúngicas	48
3	OBJETIVO GERAL	50
3.1	Objetivos específicos	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Identificação e coleta do material vegetal	51
4.2	Obtenção dos extratos brutos	52
4.3	Cultura <i>in vitro</i> de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
4.4	Cepas de Fungos	55
4.5	Animais	55
4.6	Testes biológicos <i>in vitro</i>	56
4.6.1	Preparo das amostras	56
4.6.2	Preparo do meio de cultura para os testes de triagem e cálculo do índice de concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC ₅₀)	57
4.6.3	Triagem da atividade de extratos brutos de plantas em parasitos	57
4.6.3.1	Procedimento do teste	57
4.6.3.2	Avaliação dos resultados	58
4.6.4	Determinação do IC ₅₀ dos extratos ativos	58
4.6.4.1	Procedimento do teste	58
4.6.4.2	Avaliação dos resultados	60
4.6.5	Teste de citotoxicidade	60
4.6.6	Atividade dos extratos em formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	61
4.6.7	Atividade dos extratos em fungos patógenos humanos Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	63
4.6.7.1	Preparação das amostras e dos controles	63

4.6.7.2	Preparação do meio de cultura	64
4.6.7.3	Produção do inóculo de leveduras	64
4.6.7.4	Procedimento do teste de microdiluição	64
4.6.7.5	Leitura dos resultados da concentração inibitória mínima (CIM)	65
4.7	Teste biológico <i>in vivo</i>	65
4.7.1	Avaliação comportamental do extrato bruto - Teste hipocrático	65
4.7.2	Modelo experimental em camundongos infectados com <i>L. (L.) chagasi</i>	66
4.7.2.1	Preparo do inóculo para infecção	66
4.7.2.2	Tratamento	67
4.7.2.3	Avaliação da infecção	67
4.8	Métodos cromatográficos	68
4.8.1	Cromatografia de adsorção	68
4.8.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ≈ HPLC)	69
4.9	Método Espectrométrico - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e de Carbono-13 (RMN ¹³ C)	70
4.10	Método Físico - Determinação do ponto de fusão	71
4.11	Análises estatísticas	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	ANEXOS	128

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas e parasitárias têm papel relevante na saúde pública mundial. Essas doenças estão relacionadas às condições de habitação, alimentação e higiene precárias (Osório *et al.*, 2006; OMS, 2009; Romero e Boelaert, 2010).

Dentro desse cenário, enquadra-se a leishmaniose que afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 2 a 3 milhões de novos casos a cada ano (Silva *et al.*, 2004; Croft *et al.*, 2006a; OMS, 2007), e a doença de Chagas que afeta os países das Américas, onde, 16 a 18 milhões de indivíduos possam estar acometidos (Almeida *et al.*, 2007; Dias, 2007; Briceño-León, 2009; Kropf e Sá, 2009, OMS, 2009).

Os parasitos protozoários *Leishmania ssp* e *Trypanosoma cruzi* são os agentes etiológicos causadores da leishmaniose e doença de Chagas, respectivamente. Estes parasitos são intracelulares e se multiplicam até a lise da célula hospedeira (Rodrigues *et al.*, 2006a; Almeida *et al.*, 2007).

Esses parasitos junto com outros micro-organismos como as leveduras são responsáveis por infecções patogênicas oportunistas importantes em pacientes imunodeprimidos (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009).

A leishmaniose possui as formas clínicas: visceral (LV), cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) (Rodrigues *et al.*, 2002). Em pacientes de grupos específicos, como crianças em desnutrição, indivíduos sem tratamento, e pessoas infectadas pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida); o protozoário torna-se um organismo oportunista e a doença apresenta elevada incidência e alta letalidade (Desjeux, 2004; Marques *et al.*, 2007; OMS, 2007; Antinori *et al.*, 2008).

Os medicamentos utilizados para o tratamento destas doenças demonstram variabilidade em sua eficácia, produzem reações adversas graves e apresentam casos de resistência (Oullette *et al.*, 2004; Croft *et al.*, 2006b; Osório *et al.*, 2006; Palumbo *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2009; Maltezou, 2010).

Levando-se em consideração a incidência de milhões de casos novos todos os anos e as deficiências no tratamento corrente, há uma necessidade urgente por novos medicamentos para estas doenças (Espindola *et al.*, 2004; Kolodziej e Kiderlen, 2005; de Mesquita *et al.*, 2005; Chin *et al.*, 2006; Newman e Cragg, 2007; Gachet *et al.*, 2010).

Essa situação justifica a pesquisa de novas substâncias ativas onde os produtos naturais representam uma importante fonte de busca (Chin *et al.*, 2006; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006; Espindola, 2007). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade (Rocha *et al.*, 2005). Neste contexto se insere o Cerrado, segundo maior bioma do Brasil, com ampla biodiversidade e grande potencial de plantas com compostos farmacologicamente ativos (Espindola *et al.*, 2004; de Mesquita *et al.*, 2005a; de Mesquita *et al.*, 2005b; Rodrigues *et al.*, 2006a; de Mesquita *et al.*, 2007; de Mesquita *et al.*, 2009; Melo e Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009), que possam conduzir a estratégias alternativas para o controle de doenças.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas Medicinais

A estreita relação da história da humanidade com o conhecimento sobre propriedades medicinais das plantas pode ser observada ao longo da existência humana. Por meio de tentativas, o homem selecionou as plantas de acordo com sua utilidade, podendo ser nutritiva, curativa ou até mesmo tóxica (Calixto, 2000; Kosalec *et al.*, 2009; Hefferon, 2010).

2.2. Cerrado

O termo *Cerrado* é uma palavra de origem espanhola que significa “fechado”. Esse termo tenta traduzir a característica geral da vegetação arbustiva herbácea densa que ocorre nessa formação (Souza, 1973).

O clima dessa região é estacional, com um período chuvoso, que dura de outubro a março, seguido por um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500 mm com grandes variações intra-regionais e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 22 °C e 27 °C em média (Ribeiro e Walter, 1998; Roesler *et al.*, 2007).

Os solos do Cerrado são antigos, profundos e bem drenados. Apresentam-se intemperizados, devido à alta lixiviação. Possuem baixa fertilidade natural, são ácidos e com altos níveis de ferro e alumínio (Ribeiro e Walter, 1998; Roesler *et al.*, 2007).

A área do Cerrado corresponde a mais de 2 milhões de km² do território brasileiro (Klink e Machado, 2005). Sua flora abrange entre 6 e 10 mil espécies, sendo 4.400 endêmicas (Klink e Machado, 2005; Silva e Batalha, 2006; Cianciaruso e Batalha, 2009) e para alguns grupos, como as plantas herbáceas, o nível de endemismo pode chegar a mais de 70% (Silva e Batalha, 2006; Cianciaruso e Batalha, 2009).

O Cerrado se destaca pela diversidade química dos variados e complexos metabólitos sintetizados pelas plantas (Espindola, 2007). As inúmeras influências ambientais de natureza química, física e biológica, estimulam a síntese desses compostos com esqueletos químicos e funcionais variáveis (Newman *et al.*, 2003; Cianciaruso e Batalha, 2009).

A heterogeneidade espacial do Cerrado (Figura 1), com variação dos ecossistemas ao longo do espaço, é um fator determinante para a ocorrência de um variado

número de espécies. Os ambientes variam significativamente no sentido horizontal, sendo que áreas campestres, capões de mata, florestas e veredas podem existir em uma mesma região (Eiten, 1994; Machado 2000; Amorim e Batalha, 2006; Herzog-Soares *et al.*, 2006).

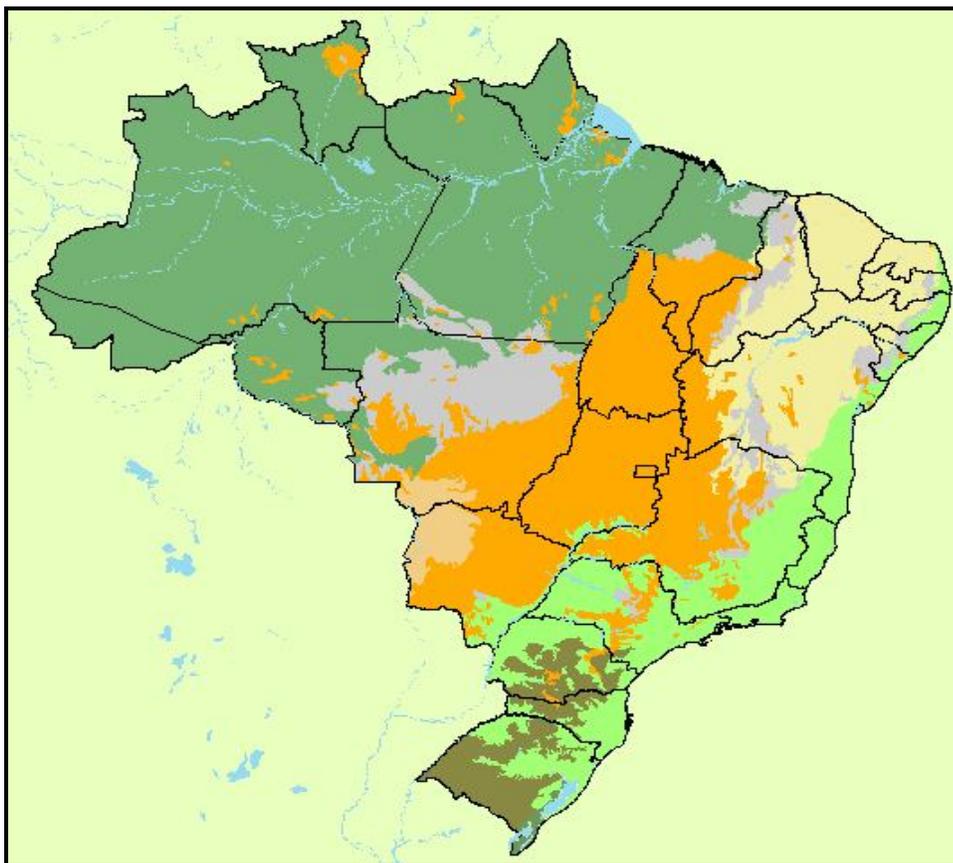


Figura 1 - Mapa dos biomas brasileiros mostrando a área central (na cor laranja) do Cerrado e as áreas de Cerrado inseridas nos outros biomas (Fonte: Machado *et al.*, 2004).

A área do bioma Cerrado corresponde a aproximadamente 22% do território brasileiro distribuindo-se nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, São Paulo e Distrito Federal, bem como em áreas remanescentes nos Estados do Pará, Roraima e Amapá (Ratter e Dargie 1992; Oliveira-Filho e Ratter 1995; Ratter *et al.*, 1997; Ribeiro e Walter, 1998; Borlaug, 2002; Roesler *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2009) (Figura 1).

Nos últimos 35 anos, mais da metade dos seus 2 milhões de km² sofreram processos de ocupação antrópica. Um estudo que utilizou imagens do satélite MODIS do ano de 2002, concluiu que 55% do Cerrado haviam sido desmatados ou transformados pela ação humana (Machado *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2008), o que

equivale a uma área de 880.000 km², ou seja, quase três vezes a área desmatada na Amazônia brasileira (Figuras 2 e 3).

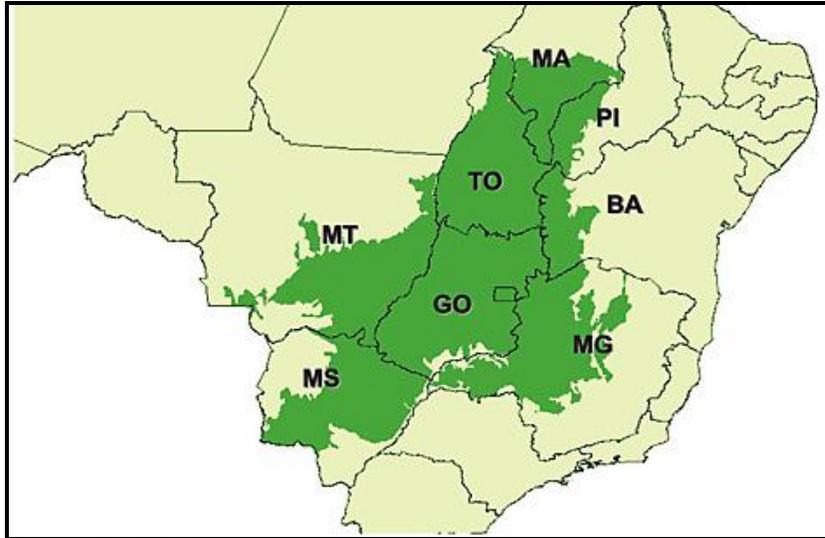


Figura 2 - Mapa que demonstra a área de distribuição original do Cerrado resultante da classificação das imagens do satélite MODIS (Machado *et al.*, 2004).

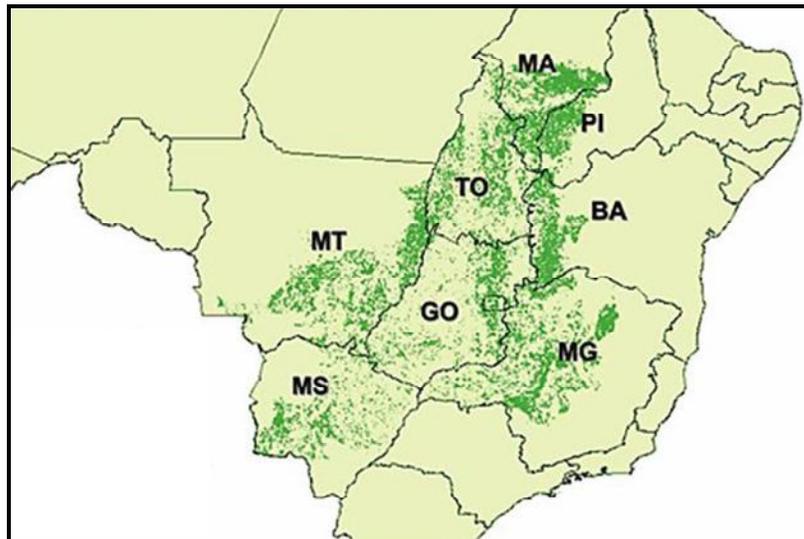


Figura 3 - Mapa resultante da classificação das imagens do satélite MODIS mostrando as áreas desmatadas na parte central do Cerrado e os principais blocos remanescentes de vegetação nativa (Machado *et al.*, 2004).

As taxas de desmatamento no Cerrado têm sido historicamente superiores às da floresta Amazônica. Porém, o esforço de conservação do Cerrado é muito inferior ao da Amazônia: apenas 2,2% da área se encontram legalmente protegida (Klink e Machado, 2005).

Essa situação classifica o Cerrado como um 'hotspot', ou seja, uma área de grande importância para a conservação da biodiversidade mundial (Pivello e Coutinho, 1996; Ratter *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 2000; Silva e Bates, 2002; Klink e Machado, 2005).

2.2.1. Formações Florestais no Cerrado

Mata Ciliar

Formação florestal densa e alta que acompanha os rios de médio e grande porte, onde a copa das árvores não forma galerias sobre a água. Apresenta árvores eretas com altura predominante entre 20 e 25 metros. As espécies típicas desta fitofisionomia perdem as folhas na estação seca. Os solos variam de rasos ou aluviais (Figura 4) (Ribeiro e Walter, 1998; Haridasan, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

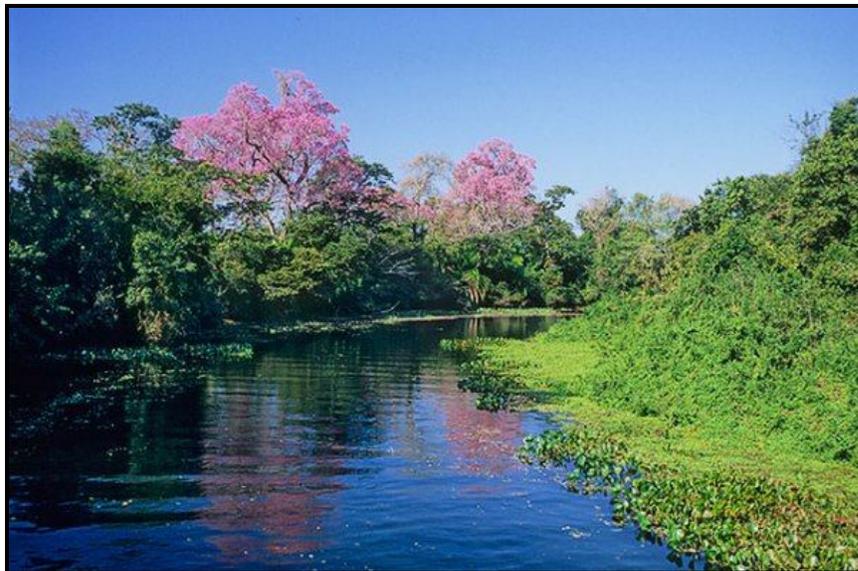


Figura 4 - Vista geral do tipo de vegetação florestal denominado Mata ciliar. Na imagem se destaca a espécie *Tabebuia avellanedae* conhecido como ipê roxo (Fonte: Embrapa 2007).

Mata de Galeria

Floresta tropical sempre-verde, não perde as folhas durante a estação seca, que acompanha os córregos e riachos, com as copas das árvores se encontrando sobre o curso d'água (Figura 5). Apresentam árvores com altura entre 20 e 30 metros. Os solos variam em profundidade, fertilidade e umidade (Silva Júnior, 2004; Santiago, 2005; Carvalho *et al.*, 2008).



Figura 5 - Vista Geral do tipo de vegetação florestal denominado Mata de galeria (Fonte: Embrapa 2007).

Mata Seca ou Mata Mesofítica

Essa formação florestal pode ser de três tipos: Mata Seca Sempre-Verde, Mata Seca Semidecídua e Mata Seca Decídua. Os dois primeiros ocorrem sobre solos desenvolvidos em rochas básicas, terra roxa estruturada e média fertilidade, latossolo vermelho-escuro. A Mata Seca Decídua ocorre sobre afloramentos de rochas calcárias. O extrato arbóreo apresenta altura que varia entre 15 e 25 metros com uma variedade de espécies eretas decíduas, semidecíduas e sempre-verdes (Figura 6) (Ribeiro e Walter, 1998; Silva Junior, 2004; Carvalho *et al.*, 2008).



Figura 6 - Vista Geral do tipo de vegetação florestal denominada Mata Seca (Fonte: Embrapa 2007).

Cerradão

Formação florestal que apresenta elementos xeromórficos, adaptados a ambientes secos e caracterizada pela composição mista de espécies de várias formações florestais (Figura 7) (Carvalho *et al.*, 2008). Apresenta espécies que estão sempre com folhas, perenifólias, e espécies que apresentam queda de folhas, caducifólia ou deciduidade na estação seca (Lindoso e Felfili, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).



Figura 7 - Vista geral do tipo de vegetação florestal denominado Cerradão (Fonte: Embrapa 2007).

2.2.2. Formações Típicas de Cerrado

Cerrado *stricto sensu*

Fitofisionomia característica do bioma Cerrado com árvores baixas e retorcidas, arbustos, subarbustos e ervas. As plantas lenhosas em geral possuem casca corticeira, folhas grossas, coriáceas e pilosas (Figura 8). Podem ocorrer variações fisionômicas devido à distribuição espacial diferenciada das plantas lenhosas e ao tipo de solo. Essas variações correspondem ao Cerrado denso, típico, ralo e rupes-tre (Balduino *et al.*, 2005).



Figura 8 - Vista geral do tipo de vegetação denominado Cerrado *stricto sensu* (Fonte: Embrapa 2007).

O Cerrado denso é predominantemente arbóreo, com cobertura de 50 a 70% e altura média de 5 a 8 metros. Cerrado típico é predominantemente arbóreo-arbustiva, com cobertura arbórea variando de 20 a 50% e altura média de 3 a 6 metros. O Cerrado ralo representa a forma mais baixa e menos densa com vegetação arbóreo-arbustiva e cobertura arbórea variando entre 5 a 20% e altura média de 2 a 3 metros (Silva *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008). O Cerrado rupestre é de constituição arbórea, arbustiva e herbácea, os solos são rasos, com afloramentos rochosos e pobres em nutrientes (Franco, 2005; Carvalho *et al.*, 2008).

Parque Cerrado

Formação caracterizada pela presença de elevações arredondadas conhecidas como murundus, em meio a um campo úmido, com diâmetro em torno de 2 a 5 metros e altura média de 50 cm (Figura 9). Alguns autores associam a origem dos murundus à atividade dos cupins (Silva *et al.*, 2007).



Figura 9 - Vista geral do tipo de vegetação denominada Parque de Cerrado com a presença dos murundus (Fonte: Embrapa 2007).

Vereda

Vegetação caracterizada pela presença da espécie *Mauritia flexuosa*, (buriti) palmeira que ocorre em meio a agrupamentos de espécies arbustivo-herbáceas (Figura 10).



Figura 10 - Vista geral do tipo de vegetação denominada Vereda (Fonte: Embrapa 2007).

2.2.3. Formações Campestres

Campo Sujo

Fitofisionomia herbáceo-arbustiva com arbustos e subarbustos espaçados entre si. Estabelece-se sobre solos rasos com pequenos afloramentos rochosos ou solos mais profundos, mas pouco férteis (Figura 11). Varia com a umidade do solo e a topografia, podendo ser classificado como Campo Sujo Úmido e Campo Sujo Seco (Pinto *et al.*, 2006).



Figura 11 - Vista geral do tipo de vegetação campestre denominada Campo Sujo (Fonte: Embrapa 2007)

Campo Rupestre

É um tipo de vegetação sobre topos de serras e chapadas de altitudes superiores a 900 m com afloramentos rochosos, onde predominam ervas e arbustos, podendo ter arvoretas pouco desenvolvidas (Figura 12). Em geral, ocorre em mosaicos, não ocupando trechos contínuos (Pinto *et al.*, 2006; Haridasan, 2007; Silva *et al.*, 2007).



Figura 12 - Vista geral do tipo de vegetação campestre denominada Campo Rupestre (Fonte: Embrapa 2007).

Campo Limpo

Fitofisionomia herbácea, com poucos arbustos e nenhuma árvore. É comumente encontrada junto às veredas, olhos d'água e em encostas e chapadas (Figura 13). Pode ser classificado em Campo Limpo Seco, quando ocorre em áreas onde o lençol freático é profundo e Campo Limpo Úmido, quando o lençol freático é superficial.



Figura 13 - Vista geral do tipo de vegetação campestre denominada Campo Limpo (Fonte: Embrapa 2007)



Figura 15 - Aspecto das folhas de *Sipanua* ssp – Família Siparunaceae (Fonte: Renner *et al.*, 2000).

O caule não apresenta feixes corticais e medulares e o xilema se apresenta sem fibras. As flores são unissexuadas, dióicas ou monóicas com pergônio caliciforme ou perianto cupulado ou urceolado, dispostas em inflorescências axilares. O androceu se apresenta com vários estames sésseis ou subsésseis e as anteras geralmente com deiscência valvar. O ovário é apocárpico com muitos carpelos, imersos em disco carnoso e um óvulo (Renner e Won, 2001). (Figura 16)



Figura 16 - Aspecto da flor de *Sipanua* ssp – Família Siparunaceae (Fonte: Renner *et al.*, 2000).

O fruto é apocárpico e apresenta pequenas drupas, que ficam contidas no interior dos lóculos do perigônio carnosos. Na maturação as paredes rompem-se, deixando as drupas em liberdade (Figura 17). As sementes apresentam endosperma não oleoso e dois cotilédones. A dispersão é feita por aves (ornitocoria) (Renner e Hausner, 1997).



Figura 17 - Aspecto dos frutos de *Sipanua* ssp. – Família Siparunaceae (Fonte: Renner *et al.*, 2000).

Plantas do gênero *Siparuna* são utilizadas pela medicina tradicional (Mendes *et al.*, 2006) no tratamento de distúrbios gastrintestinais, doenças cutâneas, constipações, febre, cefaléia e reumatismo (Correa, 1978), e como cicatrizantes (Lopez *et al.*, 1993) e ainda são consideradas como tônico, estimulante, digestivo e com propriedades carminativas (Corrêa, 1926; Leitão *et al.*, 1999; Brandão *et al.*, 2006; Brandão *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Siparuna* compõem à medicina tradicional indígena das Américas do sul e central (Schultes e Raffauf, 1990). As folhas de *Siparuna cujabana* (Mart.) A. DC. são usadas em contusões, distúrbios respiratórios e como anticoncepcional (Leitão *et al.*, 1999).

Os Índios da Amazônia usam as folhas de *Siparuna guianensis* Aublet, em forma de chá para dores reumáticas (Schultes & Raffauf, 1990).

A *Siparuna camporum* A. DC. é utilizada como estomáquica, estimulante, e no alívio de problemas respiratórios (Correa, 1978). *Siparuna apiosyce* (Mart.) A. DC. e *Siparuna guianensis* Aublet são usadas no combate à cólica, como vermífuga e contra contusões (Penna, 1941; Corrêa, 1978). *Siparuna brasiliensis* A. DC. é usada como estomáquica, estimulante, e antiespasmódica. A espécie *Siparuna obovata* (Gardn.) A. DC. é usada em problemas respiratórios e em afecções hepáticas (Corrêa, 1978).

No Brasil, a espécie *Siparuna apiosyce* é comumente chamada de limão bravo ou limão selvagem, em virtude de seu forte odor de limão e à forma dos seus frutos (Correa, 1926, 1978). Esta espécie está descrita na 1ª Farmacopéia Brasileira. A tintura das folhas é empregada em problemas gástricos e respiratórios (Dias da Silva, 1926).

Apesar de cerca de 70 espécies serem classificadas no gênero *Siparuna* (Cronquist, 1981; Hegnauer, 1990; Rener e Hausner, 1995), as pesquisas químicas e biológicas são reduzidas (Lopez *et al.*, 1990 e 1993; Leitão *et al.*, 2000).

Os alcalóides foram os constituintes mais estudados nesse gênero, quando comparados aos demais componentes: óleos essenciais, esteróides, flavonóides e sesquiterpenos (El-Seedi *et al.*, 1994; Leitão *et al.*, 2000). Outras substâncias relatadas no gênero são esqualeno, hidrocarbonetos, glicerídeos, ácidos graxos e seus éteres metílicos. Esse gênero foi considerado também como acumulador de alumínio (Gibbs, 1974, Hegnauer, 1990).

A primeira análise química do gênero *Siparuna* foi realizada por Peckolt e Peckolt (1888) empregando para esse estudo a espécie *Siparuna apiosyce*. Em 1976, Braz *et al.* realizaram o primeiro isolamento de componentes do gênero, a partir da espécie *S. guianensis*. Foram isolados do extrato hexânico do caule, dois alcalóides oxoaporfínicos: liriodenina e cassamedina. Em 1990, Lopez *et al.*, isolou da espécie *Siparuna tonduziana* Perkins, os alcalóides aporfínicos liriodenina e oxonan-

tenina, descreveu pela primeira vez os alcalóides laurotetanina, nornantenina e anonaína.

Os alcalóides mais comuns no gênero *Siparuna* são, sobretudo, liriodenina e oxonantenina (Jenett-Siems *et al.*, 2003). Alcalóides benzoquinolínicos foram também detectados no gênero *Siparuna* (Kato *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2008).

O alcalóide anonaína mostrou atividade antimicrobiana, citotóxica e hipotensora (Rios *et al.*, 1989). A liriodenina mostrou ação hipotensora, antimicrobiana, anti-leucêmica e citotóxica (Rios *et al.*, 1989). A oxonantenina se caracterizou antiagregante plaquetária e antimicrobiana (Jenett-Siems *et al.*, 2003). A laurotetanina apresentou ação hipotensora, anestésica local e espasmolítica (Rios *et al.*, 1989; Jenett-Siems *et al.*, 2003).

A presença de óleo essencial nas espécies do gênero *Siparuna* confere-lhes forte e característico odor aromático, sendo descrito em geral como cítrico (Akisue, 1977). As primeiras extrações de óleos essenciais do gênero foram realizadas em 1984 por Pekolt, entretanto não foi realizada a análise dos componentes. As espécies utilizadas na época para a extração do óleo essencial foram: *Siparuna obovata*, *Siparuna cujabana* e *Siparuna apiosyce*.

Manjarrez e Mendonça (1967) isolaram óleo essencial de *Siparuna nicaraguensis* Hemsl constituído de monoterpenos voláteis como citral, beta elemeno, beta ionona, carvona.

Akisue (1977) estudou os óleos essenciais das espécies *Siparuna cujabana*, *Siparuna brasiliensis* e *Siparuna apiosyce* e constatou a presença de carvona, limoneno, cineol, cariofileno, citral, humuleno, nerol, cedrol, mirceno e bisabolol e descreveram no óleo essencial de *Siparuna guianensis*, a presença dos compostos inéditos curzerenona e miristicina e em menor proporção curzereno, e o sesquiterpeno germacrona. Foi constatada à semelhança estrutural entre a germacrona e o germacreno, feromônio de afídeos que são insetos minúsculos que se alimentam da seiva de plantas. Segundo os autores, este fato mostrou-se interessante, visto que esses insetos visitam com freqüência as flores das espécies do gênero *Siparuna*.

Na espécie *Siparuna guianensis* foram caracterizados compostos de estrutura esteroidal como o estigmasterol e β -sitosterol (Dominguez, 1961; Braz *et al.*, 1976). Kato *et al.* (1996) constataram a presença de β -sitosterol na forma glicosilada em *Siparuna arianae* Pereira.

O β -sitosterol apresenta atividades antimicrobianas, antiinflamatórias, antipirética, inibidor de fertilidade e anticolesterol (Gupta *et al.*, 1980; Malini e Vanithakumari, 1993; Jenett-Siems *et al.*, 2000).

Com relação à presença de sesquiterpenos, o gênero não tem sido bem estudado. *Siparuna macrotepala* Perkins foi estudada por El-Seedi *et al.* (1994) que constataram a presença de sesquiterpenos do grupo cadinano, descrevendo dois compostos inéditos (1,6-dimetil-tetrahidronaftalenona-4 e 1-hidroxicalameneno). A investigação das folhas de *Siparuna pauciflora* A. DC. detectou três novos sesquiterpenos (germacrano sipaucina A, elemano sipaucina B e sipaucina C), que envolve um novo tipo de esqueleto carbônico; além de quatro alcalóides aporfínicos (norboldina, boldina, laurotetanina e N-metil- laurotetanina). Os novos sesquiterpenos apresentaram atividade biológica considerável sobre *Plasmodium falciparum* com IC₅₀ variando de 3,1 µg/mL a 5,4 µg/mL (Jenett-Siems *et al.*, 2000 e 2003).

2.4. Leishmaniose

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 350 milhões de pessoas, estão em áreas de contaminação de leishmaniose e mais de 12 milhões de pessoas em 88 países são afetadas pela doença (Pal *et al.*, 2002; Maes *et al.*, 2004; Bailey, 2007; Neitzke *et al.*, 2008).

Surgem a cada ano mais de 2 milhões de novos casos, sendo mais da metade dos casos de leishmaniose cutânea e em torno de 500 mil novos casos de leishmaniose visceral (Neto *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2005). No entanto, nem todos os casos são oficialmente declarados, pois a declaração é obrigatória em apenas 32 dos 88 países afetados pela doença (Singh *et al.*, 2006; OMS, 2007; Romero e Boelaert, 2010).

No Brasil existem cerca de 26.000 casos registrados de leishmaniose por ano, os quais estão presentes, sobretudo na região norte, nordeste e sudeste, com franca expansão pelo país (Neto *et al.*, 2004; Neitzke *et al.*, 2008).

Esta alta incidência da doença, com lesões desfigurantes, nos casos de leishmaniose tegumentar, e às vezes fatais nos casos de leishmaniose visceral, levou a OMS a incluí-la entre as seis mais importantes endemias do mundo (Desjeux, 2004; Bailey, 2007). A doença possui distribuição mundial ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais dos cinco continentes (Figura 18) (WHO/TDR, 2005; OMS, 2007; OMS, 2009; Maltezou, 2010).

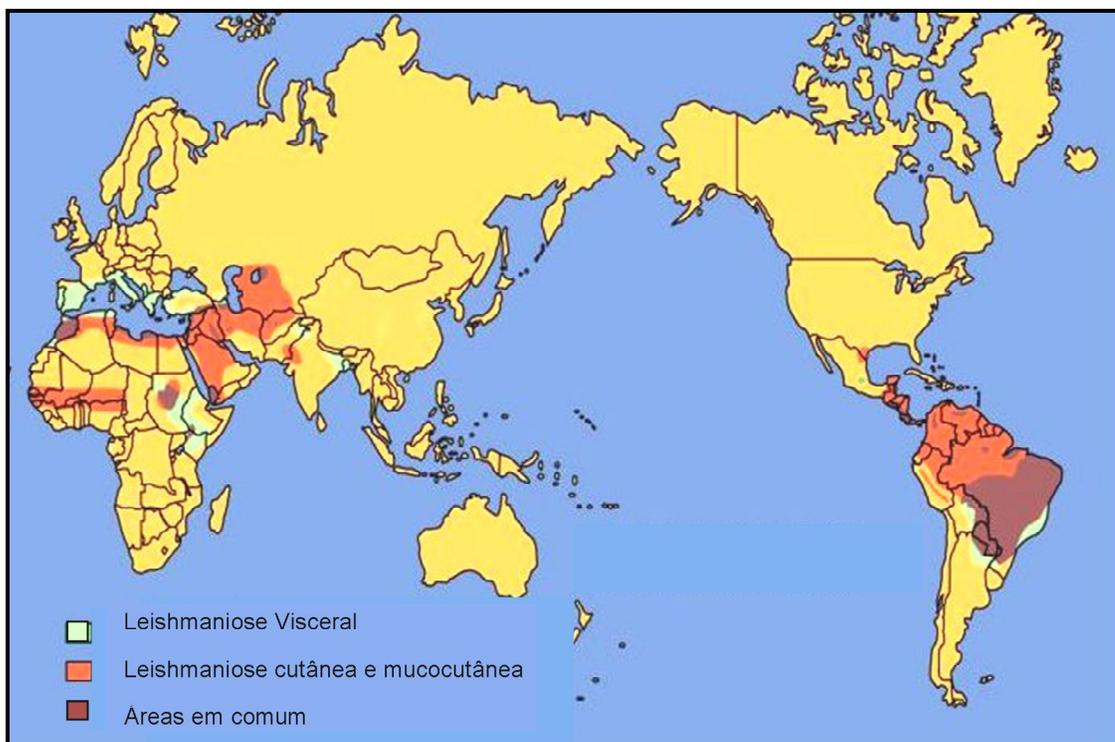


Figura 18 - Distribuição mundial da leishmaniose (OMS, 2007).

O perfil epidemiológico da doença tem se modificado ao longo do tempo. O crescimento desordenado da população, a urbanização e as modificações ambientais têm contribuído para o aumento do contato entre os seres humanos e o parasito, além do aumento do número de casos em regiões urbanas, e periurbanas (Hailu, 2005; Neitzke *et al.*, 2008).

No Brasil, Peru e Bolívia predomina-se com quase 90% os casos de leishmaniose mucocutânea (LMC). Somados a estes países tem-se o Afeganistão, Síria, Irã e Arábia Saudita, considerados os principais responsáveis pelos casos de leishmaniose cutânea (LC) (Fournet *et al.*, 1993; OMS, 2007). E mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) ocorrem em países como o Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (WHO/TDR, 2005; OMS, 2007; OMS, 2009).

De acordo com a espécie de *Leishmania* a doença pode produzir manifestações clínicas distintas: cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais que podem ser observadas na Tabela 1 (Rodrigues *et al.*, 2002; Desjeux, 2004; Soto *et al.*, 2007).

Tabela 1- Leishmanioses do Novo Mundo e seus agentes etiológicos.

Cutânea	Leishmaniose Tegumentar Americana		Leishmaniose Visceral Americana
	Cutâneo-mucosa	Cutâneo-difusa	
Complexo braziliensis <i>L. (V.) braziliensis*</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) guyanensis*</i> <i>L. (V.) panamensis</i>	Complexo braziliensis <i>L. (V.) braziliensis*</i>	Complexo mexicana <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L.(L.) amazonensis*</i>	Complexo donovani <i>L. (L.) chagasi*</i> <i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i>
Complexo mexicana <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L. (L.) amazonensis*</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i>			

Adaptado de Lainson; Shaw, 1987; Mazorchi, 1989. *ocorrência no Brasil.

A leishmaniose cutânea (LC) apresenta lesões exclusivamente na pele, limitada, e em forma de pápula, que pode progredir para úlceras abertas e nódulos (Figura 19). Esses podem ainda se disseminar pela pele caracterizando a leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figura 20). A leishmaniose mucocutânea (LMC) (Figura 21) é considerada uma complicação da LC ou LCD, como o aparecimento de lesões destrutivas em algumas mucosas (Chappuis *et al.*, 2007).



Figura 19 - Leishmaniose cutânea (LC) (OMS, 2007).

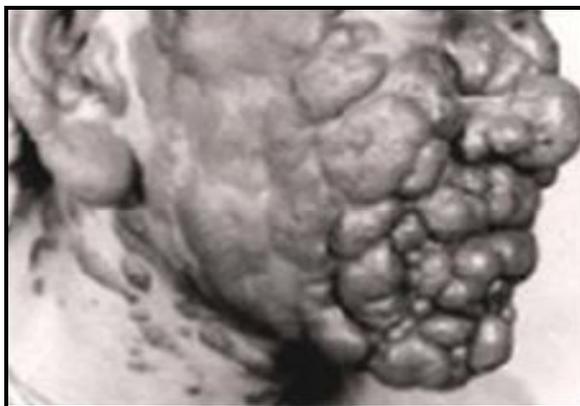


Figura 20 - leishmaniose cutânea difusa (LCD) (OMS, 2007).



Figura 21 - Leishmaniose mucocutânea (LMC) (OMS, 2007).

A forma visceral (LV) da doença se caracteriza pelo tropismo do parasito pelo sistema fagocítico mononuclear de órgãos como o fígado, o baço e a medula, que se tornam hipertrofiados (Figura 22) (Cunningham, 2002; Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005).



Figura 22- Leishmaniose Visceral (LV) (Fonte: OMS, 2007).

O ciclo de transmissão da leishmaniose é composto por hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os hospedeiros vertebrados podem variar de acordo com as espécies envolvidas e com as manifestações clínicas. As formas tegumentares possuem como hospedeiros, além do homem, animais silvestres e domésticos. Já nas manifestações viscerais, os hospedeiros são canídeos silvestres, cães domésticos e também o homem (Camargo, 2003; Azevedo *et al.*, 2008; OMS, 2009).

Os vetores ou hospedeiros invertebrados da leishmaniose são dípteros do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no continente americano. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é o vetor mais importante (Pinto *et al.*, 2010). A espécie *Lutzomyia cruzi* também pode ser responsável pela transmissão em alguns Estados do Brasil (Gontijo e Melo 2004; Camargo-Neves e Santucci, 2005).

Nenhuma outra espécie de flebotomíneo é tão sinantrópica quanto a *Lutzomyia longipalpis*, ou seja, esta espécie está totalmente adaptada ao meio urbano onde encontram condições para proliferação e infecção (Gontijo e Melo, 2004; Camargo-Neves, 2005; Medeiros *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2010).

Essa espécie era encontrada somente nas matas das regiões norte e nordeste do Brasil fazendo parte apenas do ciclo primário ou silvestre. No final dos anos 80, verificou-se sua distribuição por todo o país, com exceção da região sul. Nas periferias de grandes centros urbanos é encontrada em domicílios e peridomicílios, caracterizando o novo perfil epidemiológico da doença (WHO/TDR, 2005; OMS, 2009)

Conhecidos por vários nomes como cangalha, cangalhinha, birigui, tatuíra, mosquito palha ou asa dura, o inseto da espécie *Lutzomyia longipalpis* mede de 1 a 3 milímetros de comprimento e possui o corpo e asas pilosos (Almeida, 2003; Piscopo e Mallia, 2007) (Figura 23). Voam em pequenos saltos, o que limita seu deslocamento próximo ao solo, à vegetação, bem como em raízes e/ou troncos de árvores, além de tocas de animais. Preferem ambientes sombreados com pouca luz e alta umidade (80%), temperaturas entre 20 e 30 °C e acúmulo de matéria orgânica, onde ficam protegidos do vento e contra predadores naturais (Rodas e Poletto, 2001; Camargo-Neves e Santucci, 2005; Pinto *et al.*, 2010).



Figura 23 - *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose (Fonte: OMS, 2007).

Somente as fêmeas se alimentam de sangue, pois a hematofagia é necessária para maturação dos ovos. Os machos se alimentam do néctar das plantas (WHO/TDR, 2005; Medeiros *et al.*, 2005; OMS, 2009).

O parasito da *Leishmania* é um protozoário pleomórfico, que se reproduz por divisão binária, e durante o seu ciclo de vida, se apresenta sob as formas: promastigota, amastigota, paramastigota e promastigotas metacíclicas. As formas de reprodução são a amastigota, no hospedeiro vertebrado, e a forma promastigota, no hospedeiro invertebrado. O ciclo biológico da *Leishmania* se inicia pela picada da fêmea do flebotomíneo infectado, que durante a hematofagia introduz formas promastigotas metacíclicas infectantes no hospedeiro vertebrado (Figura 24).

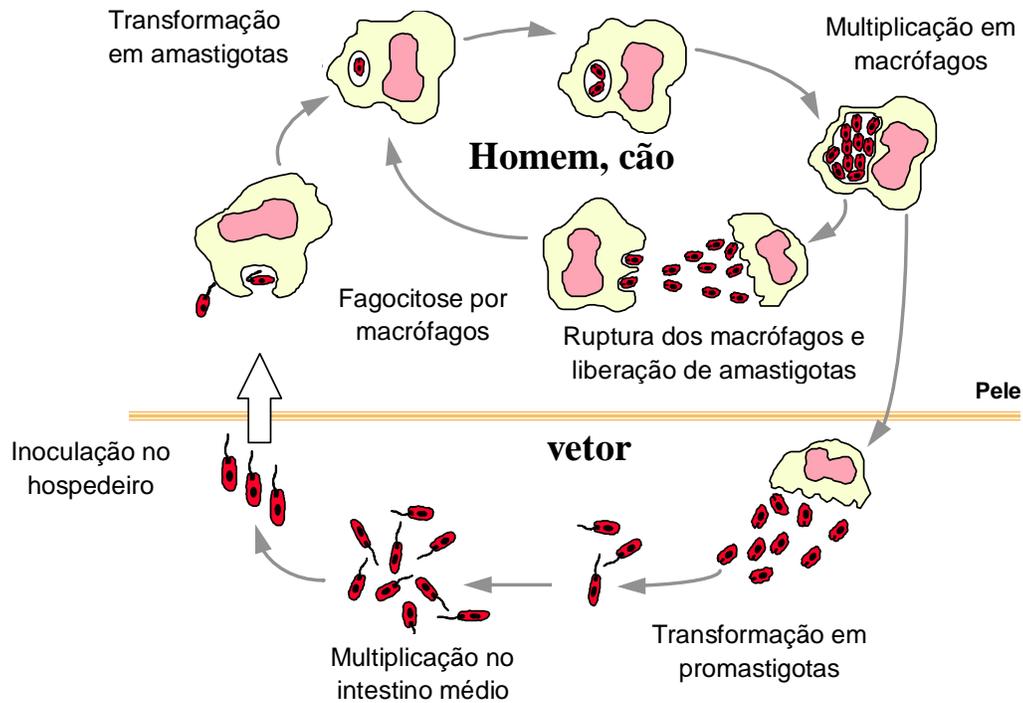


Figura 24 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (WHO/TDR, 2005).

Alguns autores sugerem que na população canina a transmissão se dê por meio da ingestão de carrapatos infectados, e também por mordeduras, cópula e ingestão de vísceras contaminadas, porém não há evidências sobre a importância epidemiológica desses mecanismos de transmissão para humanos (Ashutosh *et al.*, 2007; Antinori *et al.*, 2008).

Co-infecção *Leishmania* spp. e HIV

O surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) trouxe a re-emergência e, principalmente, o aumento da incidência de doenças ligadas à imunossupressão celular, causadas por micobactérias, fungos e protozoários (Dujardin, 2005; OMS, 2007; Catorze, 2005; Carranza-Tamayo, 2009).

O primeiro caso de leishmaniose associado à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi relatado em 1985 (OMS, 2007; OMS 2009). A distribuição global dos casos reportados de infecção concomitante do HIV e leishmaniose visceral pode ser vista na figura 25. A co-infecção é descrita em várias partes da Europa (Catorze, 2005; OMS, 2007; Pourahmad *et al.*, 2008). A doença se apresenta com comportamento tipicamente oportunista, havendo, principalmente, reativação de in-

fecção prévia e, ainda, infecção recente, quer seja por cepas pouco ou altamente patogênicas (Marques *et al.*, 2007; OMS 2007; Pourahmad *et al.*, 2008).



Figura 25 - O mapa mostra a distribuição global dos casos reportados de co-infecção *Leishmania* ssp./HIV e a distribuição dos casos de leishmaniose (reproduzido do site http://www.OMS.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2007_1leish/en/index.html)

O comportamento epidemiológico e clínico da leishmaniose visceral na região do Mediterrâneo preenche critérios de doença caracterizadora de AIDS. Entretanto, em regiões onde as leishmanioses são consideradas endêmicas, como no Brasil, os critérios não estão bem definidos, embora alguns aspectos da co-infecção *Leishmania*/HIV favoreçam a definição da leishmaniose como doença oportunista (Pandey, 2009; Carranza-Tamayo, 2009; Pourahmad *et al.*, 2008).

No Brasil, os dados até agora disponíveis em relação à co-infecção *Leishmania*/HIV não permitem conclusão definitiva sobre o comportamento oportunista da *Leishmania*. Entretanto, a freqüente reativação de infecção primária, descrição de formas clínicas viscerais causadas por *Leishmania* dermatrópicas e ocorrência de apresentações clínicas tegumentares atípicas, são muito sugestivas de comportamento oportunista da leishmaniose visceral e tegumentar na AIDS (OMS 2007; Pourahmad *et al.*, 2008).

Controle da leishmaniose no Brasil

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da leishmaniose, as estratégias de controle desta endemia ainda são pouco efetivas. Estas medidas concentram-se no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da

população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde (MS, 2006a; Chappuis *et al.*, 2007; Romero e Boelaert, 2010).

Até o ano de 2003, as estratégias de controle, realizadas muitas vezes de forma isolada e sem continuidade, não foram efetivas para reduzir a incidência, o que determinou a reavaliação do Plano de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Pelas novas diretrizes, os estados e municípios sem ocorrência de casos humanos ou caninos também foram incluídos nas ações de vigilância, com o objetivo de evitar ou minimizar a expansão da doença (MS, 2003; 2006b). Onde ocorre a transmissão, as medidas são distintas, adequadas e realizadas de forma integrada. O PCLV é aplicado em áreas urbanas ou rurais.

As ações voltadas para o homem incluem a busca ativa e passiva de casos humanos suspeitos e manutenção de centros capacitados para atendimento dos doentes. O tratamento deve ser precoce, para promover a recuperação dos pacientes, diminuir a mortalidade e a morbidade, e reduzir o foco de infecção, onde o homem pode servir de reservatório (Costa e Vieira, 2001; MS, 2003; Medeiros *et al.*, 2005).

O controle químico é a medida de controle vetorial recomendada no âmbito da proteção coletiva. Esta medida é dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana, e conseqüentemente, diminuir o risco de transmissão da doença (MS, 2003, 2006b, Camargo-Neves e Santucci, 2005).

Este controle é realizado com aspersão de inseticidas no domicílio, áreas peridomiciliares e anexos, principalmente nos abrigos dos animais domésticos (Camargo-Neves e Santucci, 2005; Medeiros *et al.*, 2005). Os inseticidas mais eficazes contra flebotomos são os de efeitos residuais, como os clorados, os fosforados e os piretróides sintéticos (Rodas e Polleto, 2001; Ribeiro e Michalick, 2001).

Com relação às orientações dirigidas ao controle do reservatório canino, a prática da eutanásia é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo. Para a realização da eutanásia, deve-se ter como base a Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências (MS, 2006a; Trigo *et al.*, 2010).

Entretanto, a eutanásia dos cães é um procedimento controverso. O critério usado na seleção dos cães a serem eliminados é o resultado do diagnóstico sorológico RIFI (método de imunofluorescência indireta). Neste teste, a sensibilidade é de

90-100% e a especificidade de 80%. Isso compromete a efetividade e a credibilidade do resultado já que deixa de detectar e sacrificar animais infectados, os falsos negativos e, por outro lado, recomendam o sacrifício de animais não infectados, os falsos positivos. Assim, as taxas de infecções são subestimadas e vários cães infectados são mantidos em áreas endêmicas (Alves e Bevilacqua, 2004; Nunes *et al.*, 2010).

Outro problema relacionado à prática da eutanásia de cães soropositivos é a ligação sentimental entre os animais e seus donos. Muitos proprietários de cães se recusam a permitir o procedimento, contribuindo para a manutenção da cadeia de transmissão (Ribeiro e Michalick, 2001; Nunes *et al.*, 2010). A OMS reconhece que existem cães de grande valor afetivo, econômico e prático, por isso, não podem ser mortos indiscriminadamente (Ribeiro e Michalick, 2001; OMS, 2006).

O PCLV diz que o extermínio é uma política equivocada e ultrapassada que segue as recomendações do 6º Informe Técnico da OMS de 1973, já em desuso na maior parte do mundo. Além disso, o 8º Informe Técnico de 1992 diz que a renovação da população canina se sobrepõe à taxa de eliminação. Para a OPAS, o controle populacional, por meio da captura e esterilização, aliados à educação para a posse responsável de animais são as estratégias aceitas mundialmente (OPAS/OMS, 2006; Nunes *et al.*, 2010).

Uma alternativa é o uso de coleiras com inseticidas na proteção dos cães. No Brasil, estudos concluíram que a utilização de coleiras com deltametrina a 4% é mais efetiva que a eutanásia de cães soropositivos (Gontijo e Melo, 2004; Camargo-Neves *et al.*, 2005; Glasser, 2005). E banhos sistemáticos com deltametrina indicaram redução da prevalência da doença canina na China (Camargo-Neves *et al.*, 2005).

Outro fator determinante para a prevenção e o controle da doença é a inclusão social. Nos países em desenvolvimento, as ações dirigidas para controlar determinado problema de saúde em uma população afetada ou exposta deixam de lado a educação popular como medida sanitária concreta; Este é um ponto débil que, na maioria das vezes, pode levar ao fracasso dos programas de controle, como ocorreu com a doença de Chagas em países como Brasil e Argentina (Gama *et al.*, 1998; MS, 2006a).

Assim, as atividades de educação em saúde têm que estar inseridas em todos os serviços que desenvolvem as ações de controle da LV, requerendo o envolvimento efetivo das equipes multiprofissionais e multi-institucionais com vistas ao

trabalho articulado nas diferentes unidades de prestação de serviços (MS, 2006a). As comunidades atingidas precisam aprender a se proteger e participar ativamente das ações de controle (OPAS/OMS, 2006; Chappuis *et al.*, 2007; Romero e Boelaert, 2010).

Tratamento

Historicamente, a quimioterapia da leishmaniose tem sido baseada no uso dos antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, como o Pentostan[®] (estilbogluconato de sódio) e Glucantine[®] (antimoniato de meglumina) (Brendle *et al.*, 2002). Os fármacos de segunda escolha como a pentamidina e anfotericina B, são importantes na terapia combinada, ou em casos de tratamento resistente aos antimoniais (Sundar *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2010). No entanto, esses medicamentos necessitam de administração parenteral e o tratamento é longo. Os efeitos secundários são graves além das altas taxas de recaída, em especial, nos pacientes imunocomprometidos (Kayser *et al.*, 2003; Croft *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Sundar *et al.*, 2010).

Os efeitos tóxicos registrados com ambos os fármacos, correspondem a nefrotoxicidade com o uso da anfotericina B, e cardiotoxicidade e pancreatite com os antomoniatos (Croft, 2006). O tratamento com anfotericina B lipossômica apresenta menor toxicidade, entretanto há recidivas em cerca da metade dos casos (Kayser *et al.*, 2003; Seifert *et al.*, 2003; Palumbo *et al.*, 2008; Sundar *et al.*, 2010), além do seu alto custo.

A terapia tem sido ainda mais complicada pelo grande número de crianças infectadas, pacientes imunocomprometidos e diminuição da eficácia dos compostos antimoniais pentavalentes. Provavelmente, deve-se ao desenvolvimento de resistência dos patógenos. Essa situação justifica a busca de novos compostos como alternativa de controle (Palumbo *et al.*, 2008; Maltezou, 2010).

A miltefosina (Impavid[®]), hexadecilfosfocolina, é o mais novo medicamento leishmanicida aprovado (2002), e primeiro medicamento oral altamente eficiente em infecções viscerais por *Leishmania* em humanos (Bhattacharya *et al.*, 2007). Esse fármaco foi introduzido como tratamento oral em regiões endêmicas da Índia (Sundar *et al.*, 2006). Sua associação ao fluconazol, também administrado via oral, apresenta efetividade sobre leishmaniose cutânea (Oullette *et al.*, 2004). Originalmente foi desenvolvido como um agente antitumoral, mas desde o final dos anos 80 sua

atividade leishmanicida foi descrita, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Palumbo *et al.*, 2008; Romero e Boelaert, 2010).

A miltefosina foi o primeiro medicamento a apresentar atividade sobre *L. (L.) donovani in vitro* (Paris *et al.*, 2004). Devido sua recente utilização, não se têm muitos dados em relação à resistência dos parasitos (Seifert *et al.*, 2003; Palumbo *et al.*, 2008). Mas o uso intensivo deste medicamento já demonstrou sinais de resistência, provavelmente associada com a glicoproteína-p que faz a captação de miltefosina para o interior da célula (Belliard, 2003; Croft *et al.*, 2006; Maltezou, 2010).

2.5. Doença de Chagas

É uma infecção zoonótica causada pelo *Trypanosoma cruzi*, que é um protozoário hemoflagelado, pertencente à ordem *Kinetoplastidae*. Três estágios morfológicos estão presentes no ciclo do protozoário: amastigota, epimastigota e tripomastigota (Zaidenberg *et al.*, 2000; Coura e Castro, 2002; Almeida *et al.*, 2007; Carod-Artal, 2009; Kropf e Sá, 2009; Boscardin *et al.*, 2010).

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana afeta os países das Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Estima-se que na América Latina, 16 a 18 milhões de indivíduos possam estar acometidos, e no Brasil 1,8 a 2,4 milhões na fase crônica da doença. Cerca de 120 milhões de pessoas estão expostas ao risco em todo continente americano (Kropf, 2005; Teixeira *et al.*, 2006; OMS, 2007; Briceño-León, 2009).

A principal forma de transmissão é por meio de insetos triatomíneos hematófagos pertencentes à família Reduviidae, conhecidos vulgarmente como “barbeiros” (Sherlock, 2000). Epidemiologicamente é a forma de transmissão mais importante (Shmunis, 2000). Porém, pode ser transmitida por transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidente laboratorial, transmissão oral, coito e transplante (Shmunis, 2000; Teixeira *et al.*, 2006; Castro, 2009).

Durante a hematofagia, o triatomíneo elimina tripomastigotas metacíclicos em suas fezes. Estas formas infectantes também podem penetrar as mucosas através dos olhos. O tripomastigota invade células do sistema mononuclear, perde o flagelo, se transformando em amastigota. Ocorre multiplicação por divisão binária até que a célula fique repleta de amastigotas, em seguida as amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas. A célula se rompe liberando tripomastigotas, que disseminam através da circulação sanguínea e sistema linfático. Essas formas

tripomastigotas conseqüentemente alcançam outros órgãos, principalmente coração, tubo digestivo e plexos nervosos (Zaidenberg *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2006) (Figura 25). Ao se alimentarem de sangue de pessoas ou animais infectados, os triatomíneos podem ingerir tripomastigotas que são convertidos em epimastigotas em seu tubo digestivo. Estes se reproduzem por divisão binária e ao alcançarem a porção final do intestino do inseto transformam-se novamente em tripomastigotas (Zaidenberg *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2006) (Figura 26).

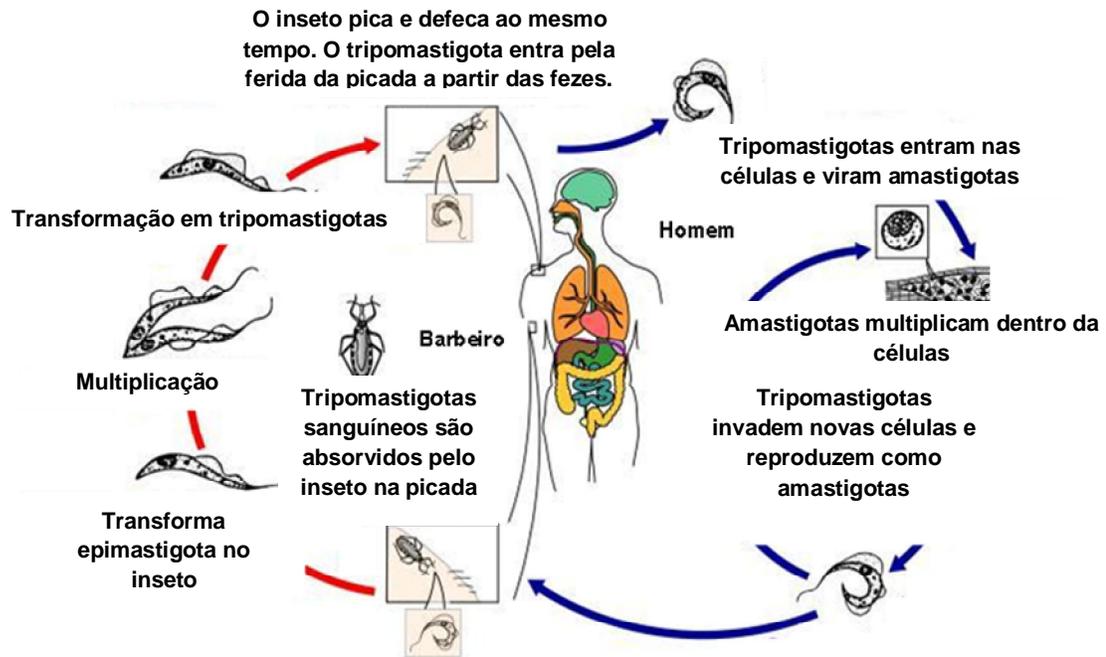


Figura 26 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (OMS, 2006).

Para o tratamento da doença de Chagas os fármacos mais utilizados são nifurtimox e benznidazol (Coura e Castro, 2002; Osório *et al.*, 2006). Em 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do benznidazol foram cedidos ao Brasil pela Roche, e passou a ser produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (Schoffield *et al.*, 2006). Esses medicamentos suprimem a parasitemia e são utilizados na fase aguda da doença, através de sua ação contra tripomastigotas circulantes. Porém, são menos eficazes contra a infecção crônica, pois neste caso devem ser administrado por tempo prolongado e tornam-se tóxicos. Os mecanismos de ação e resistência ainda não são bem compreendidos, apesar do conhecimento acerca da produção de radicais livres intracelulares (Sosa-Estani *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2009).

2.6. Infecções Fúngicas

Ao longo da última década a incidência de infecções fúngicas tem aumentado. As infecções hospitalares oportunistas, principalmente por leveduras, aparecem em pacientes em tratamento de neoplasias, ou nos casos de transplante de órgãos, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), lupus eritematoso sistêmico, entre outras doenças que causam imunodepressão (Nucci e Marr 2005; Macêdo *et al.*, 2008).

Atualmente, podemos evidenciar uma mudança marcante no perfil epidemiológico das infecções por leveduras, com descrição de espécies emergentes (Richardson e Lass-Flörl, 2008). Estas leveduras apresentam a habilidade de passar da condição de comensais a patógenas. Isto acontece quando os diversos fatores de virulência, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases e as condições no hospedeiro são favoráveis (Reynolds, 2009).

Os fungos mais comumente isolados de infecções oportunistas são *Candida albicans* e não *albicans*; *Cryptococcus neoformans*; *Aspergillus*, (predominando o *Aspergillus fumigatus*; *Fusarium* sp., *Cephalosporium* sp., *Rhodotorula rubra*, *Cladophialophora bantiana*, *Exophiala* sp. (Ceccil, 2005).

2.6.1. Candidíase

As leveduras do gênero *Candida* são frequentes no hospedeiro imunocomprometido, com aproximadamente 20 espécies reconhecidamente patogênicas destacando-se *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* (Macêdo *et al.*, 2008). O diagnóstico é considerado difícil e as taxas de morbidade e mortalidade, são altas apesar das terapias antifúngicas (Slavin *et al.*, 2010). Sua presença na microbiota humana propicia a ocorrência de infecções, principalmente devido aos fatores de virulência do fungo e a interação com pacientes hospitalizados, com debilidade do sistema imunológico. Fármacos poliênicos e azólicos constituem o principal recurso terapêutico (Slavin *et al.*, 2010).

A candidíase oral é a manifestação clínica mais comum, a candidíase esofágica está associada à imunodepressão mais profunda e gastrointestinal está mais relacionada ao câncer terminal e à antibioticoterapia prolongada (Loss *et al.*, 2010). Pode ocorrer candidíase sistêmica e candidemia, que é mais frequente nos pacientes pós-transplantados, portadores de lesão ou prótese de Válvulas cardíacas, por-

tadores de leucemia e nos submetidos à nutrição parenteral prolongada (Feng *et al.*, 2009).

2.6.2. Criptococose

É uma infecção principalmente oportunista ocorrendo com grande frequência em pacientes imunodeprimidos, quase sempre sob a forma de lesões nos pulmões ou sistema nervoso central. Com a epidemia de AIDS sua frequência tem aumentado significativamente (Kuria, *et al.*, 2009; Deok-Jong Yoo *et al.*, 2010)

A criptococose é provocada, principalmente por: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C)

O *Cryptococcus* pode penetrar no hospedeiro por via inalatória, oral ou transdérmica. Normalmente é inalado, e causa inicialmente, uma infecção pulmonar. A principal defesa do hospedeiro é a fagocitose, dependente de complemento, por macrófagos e neutrófilos (Kessler *et al.*, 2010, Pfaller *et al.*, 2010).

A imunidade celular apresenta um papel importante na defesa contra a criptococose. Assim, é grande a incidência da doença em pacientes transplantados, leucêmicos, HIV - positivos, pacientes com linfomas ou em uso prolongado de corticoterapia (Kuria *et al.*, 2009; Neofytos *et al.*, 2010)

Em indivíduos sadios, a infecção localiza-se nos pulmões e não causa sintomas. Se o hospedeiro tornar-se imunodeprimido, micro-organismos que persistiram de infecções prévias, ou em casos de reinfecções, podem se reativar e disseminar-se para outros locais.

Assim, pessoas imunocompetentes ou imunossuprimidas estão sujeitos a uma série de complicações infecciosas provocadas por protozoários e fungos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é investigar moléculas extraídas de plantas do bioma Cerrado, ativas em *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e em espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade de extratos de plantas do bioma Cerrado sobre protozoários e fungos.

3.1. Objetivos específicos

Selecionar extratos brutos ativos *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Avaliar a atividade dos extratos ativos *in vitro* em formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Avaliar a atividade dos extratos ativos em espécies de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*.

Verificar a citotoxicidade dos extratos ativos em células de mamíferos.

Avaliar a atividade de um extrato selecionado ativo em modelo experimental de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Realizar o fracionamento cromatográfico de um extrato selecionado ativo e monitorar a atividade em *Leishmania*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Identificação e coleta do material vegetal

As espécies vegetais do Cerrado foram coletadas com o auxílio do botânico Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília, no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2008, no bioma Cerrado, no entorno do Distrito Federal. As espécies foram identificadas e as exsicatas são mantidas no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB) para garantir a autenticidade das espécies coletadas. Na tabela 2 podem ser observadas as espécies coletadas e o seu número de Herbário.

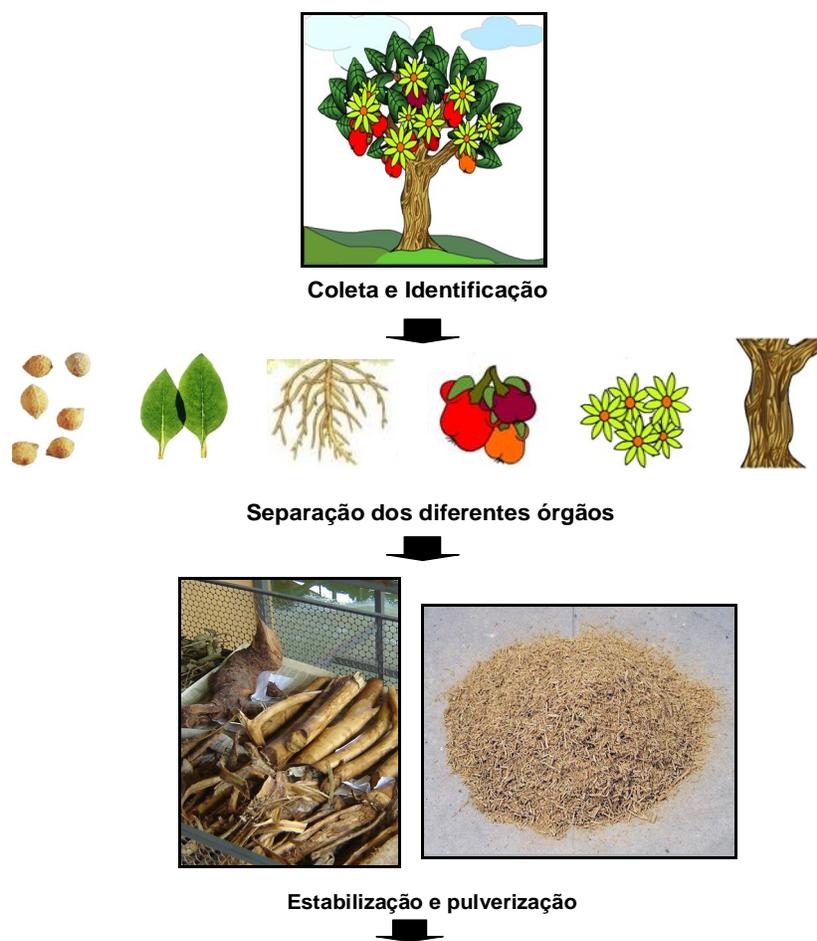
Tabela 2- Espécies de plantas coletadas no bioma Cerrado.

Família	Espécie	Número Herbário
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	(UB) 3753
Annonaceae	<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schlttdl.	(UB) 3703
Apocynaceae	<i>Condylocarpon isthmicum</i> (Vell.) A. DC.	(UB) 3663
	<i>Peschiera affinis</i> Miers	(UB) 3717
Asteraceae	<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.	(UB) 3721
	<i>Eremanthus sphaerocephalus</i> Baker	(UB) 3708
Bignoniaceae	<i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stellfeld	(UB) 3691
	<i>Anemopaegma chamberlaynii</i> (Sims.) Dur. Ik.	(UB) 3715
	<i>Arrabidaea florida</i> DC.	(UB) 3714
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> L. Marchand	(UB) 3689
	<i>Protium ovatum</i> Engl.	(UB) 3694
Ebenaceae	<i>Diospyros hispida</i> A. DC.	(UB) 3760
Magnoliaceae	<i>Talauma ovata</i> A. St. - Hil.	(UB) 3738
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	(UB) 3743
Meliaceae	<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	(UB) 3712
Mimosaceae	<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	(UB) 3739
Rubiaceae	<i>Sabicea brasiliensis</i> Wernham	(UB) 3709
	<i>Chomelia pohliana</i> Müll. Arg.	(UB) 3741
Sapindaceae	<i>Matayba guianensis</i> Aublet	(UB) 3697
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum soboliferum</i> Rizzini	(UB) 3733
	<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	(UB) 3672
	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radek.	(UB) 3671
	<i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radek.	(UB) 3674
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aublet	(UB) 3720
(Monimiaceae)	<i>Siparuna cujabana</i> A. DC.	(UB) 3737
Zingiberaceae	<i>Renealmia alpinia</i> (Rottboell) Maas	(UB) 3719

4.2. Obtenção dos extratos brutos

Após a coleta, os órgãos vegetais foram separados (folhas, casca e madeira do caule e da raiz, rizoma e frutos), dessecados, estabilizados e pulverizados no Laboratório Prof. José Elias de Paula - Anexo do laboratório de Farmacognosia /UnB.

O pó do material vegetal foi submetido à maceração com múltiplos contatos (4 x 1 semana) com solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e solução hidroetanólica 90%. A solução extrativa foi recuperada por filtração e concentrada em rotaevaporador e dessecada por meio de soprador térmico. Os diferentes extratos brutos obtidos foram conservados em recipientes apropriados, rotulados e armazenados a -20 °C. Esses extratos compõem o Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília. A figura 27 demonstra as etapas de obtenção dos extratos.





Maceração



Filtração



Dessecação



Extrato bruto

Figura 27 – Esquema da metodologia de preparo dos extratos vegetais.

4.3. Cultura *in vitro* de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Trypanosoma cruzi*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foram obtidas da cepa MHOM/BR/PH8, mantidas criopreservadas e repicadas em linhagem de camundongos C57Bl6. Essa cepa foi fornecida pelo Laboratório de Dermatocologia/UnB. Os protozoários dessa cepa criopreservada foram inoculados nas patas dos camundongos por injeção intraplantar, para a manutenção da virulência. Para a utilização da cepa, os parasitos foram retirados das patas dos camundongos infectados e transferidos para o meio de cultura sólido, McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN) (figura 28) a 22 °C por uma semana. Após esse período, os parasitos foram transferidos para o meio de cultura líquido RPMI (Sigma®) contendo 20% de soro fetal bovino e mantidos em estufa a 22 °C até serem utilizados nos testes.



Figura 28 - Meio de cultura sólido, McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN)

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* pertencem à cepa MCER/BR/79/M6445, fornecida pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical/UnB. Essa cepa é mantida criopreservada e antes dos testes é inoculada em hamsters para a manutenção da virulência da cepa. Os parasitos foram então, retirados do baço e fígado dos hamsters e transferidos para o meio de cultura sólido, McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN) (figura 28) a 22 °C por uma semana e, posteriormente, em meio líquido Schneider (Sigma®) contendo 10% de soro fetal bovino onde permanecem até serem utilizados nos testes.

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram obtidas do isolado CL Brener a partir de culturas *in vitro* de células L-6 infectadas, cedidas pelo Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro/UnB. A cultura e manutenção da cepa foram feitas em meio líquido LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 5% de soro fetal bovino e 6 mg/mL de ampicilina, em estufa de 28 °C até o momento dos testes.

A curva de crescimento foi acompanhada por meio da contagem do número de parasitos, com auxílio de uma câmara de Neubauer (figura 29). O valor de formas /mL é determinado para cada teste.

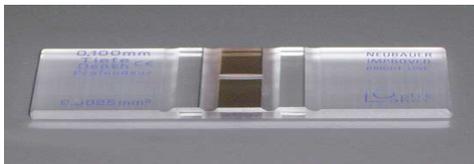


Figura 29 - Câmara de Neubauer

4.4. Cepas de Fungos

Para o teste de microdiluição utilizou-se cepas de leveduras cedidas pelo Laboratório de Micologia de Goiás (LMGO) das seguintes espécies padrões: *Candida albicans* (C.a. ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (C.p. ATCC 22019) e os isolados clínicos: *Candida glabrata* (C.g. LMGO 44), *Candida krusei* (C.k. LMGO 174), e espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*.

4.5. Animais

Para a manutenção das cepas de *Leishmania (L.) chagasi* foram utilizados hamsters golden da espécie *Mesocricetus auratus*.

Para a manutenção da cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (Figura 30) que são mais resistentes a leishmaniose com lesões que crescem e ulceram rapidamente, mas regridem e curam dentro de cinco meses ou evoluem lentamente e regridem sem ulcerar (Calabrese e Gonçalves da Costa, 1992).



Figura 30 - Camundongos C57BL/6

Para a obtenção dos macrófagos utilizados nos testes de amastigotas e no modelo experimental de infecção foram utilizados camundongos BALB/c adultos de $18 \pm 2,0$ g.

Para o modelo experimental de infecção foram utilizadas apenas as fêmeas. Os camundongos BALB/c (figura 31) são considerados mais suscetíveis à infecção por leishmaniose e são preconizados para os modelos em questão.



Figura 31- Camundogos Balb/c

Para o teste de avaliação comportamental foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-Webster, adultos, com idade de 1,5 a 3 meses, de ambos os sexos, pesando $23 \pm 5,0$ g.

Todos os animais foram mantidos no Biotério FS/FM em gaiolas de polipropileno forrada com serragem, água e ração Purina[®] (Labina) *ad libitum*, temperatura controlada 22 ± 2 °C, umidade de 40 – 50% (± 10) e ciclo de luz claro/escuro de 12 h.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Brasília (Anexo I).

4.6. Testes biológicos *in vitro*

4.6.1. Preparo das amostras

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

4.6.2. Preparo do meio de cultura para os testes de triagem e cálculo do índice de concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC₅₀)

O meio utilizado para o teste com *Leishmania* ssp. é o meio líquido Schneider (Sigma[®]) que já vêm pronto para uso e deve ser suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®]). Para o teste *T. cruzi* o meio utilizado é o meio LIT em pó reconstituído e suplementado com 5% de soro fetal bovino e 6 mg/mL de ampicilina, que em seguida é filtrado em fluxo laminar utilizando um sistema de filtração a vácuo com membrana de poro 0,22 µm. Três alíquotas de 3 mL desse meio são separadas e colocadas em estufa 37 °C para controle de esterilidade, permanecendo pelo menos 3 dias. Caso o meio fique turvo, este deve ser desprezado, pois a turbidez indica crescimento de microorganismos, caso contrário o meio foi liberado para uso.

4.6.3. Triagem da atividade de extratos brutos de plantas em parasitos

4.6.3.1. Procedimento do teste

O teste realizado para a triagem de extratos vegetais é baseado em viabilidade celular do parasito observada em microscópio invertido, modelo utilizado normalmente para triagem de muitos extratos (Weniger *et al.*, 2001; de Mesquita *et al.*, 2005a). Para a realização do teste de triagem de atividade a solução estoque dos extratos foi diluída em meio de cultura estéril na proporção de 1:3 (solução em DMSO: meio), obtendo-se uma concentração final de 2,5 mg/mL. A triagem da atividade biológica foi analisada à concentração de 100 µg/mL. Para tal, a cada poço de uma placa de cultura celular de 96 escavações de fundo chato foi adicionado 100 µL de meio Schneider suplementado para os testes com *Leishmania* ssp. e 100 µL de meio LIT suplementado, para os testes com *T. cruzi*. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 8 µL de extratos diluídos em meio de cultura (2,5 mg/mL), 10⁶ formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) amazonensis* ou 10⁶ formas epimastigotas de *T. cruzi* e por fim, meio de cultura Schneider (testes com *Leishmania* ssp.) ou LIT (teste com *T. cruzi*) em quantidade suficiente para (q.s.p) 200 µL. A placa foi incubada por 48 h à 22 °C para os testes com *Leishmania* ssp. e por 72 h a 28 °C para os testes com *T. cruzi*. Após o período de incubação foi realizada a análise de viabilidade dos parasitos.

Para o controle positivo foram utilizados os fármacos referência do teste: miltefosina (25 µg/mL) para o teste com *Leishmania* ssp. (Camacho *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2005; Maltezou, 2010) e o benznidazol (100 µg/mL) para o teste com *T. cruzi* (Lirussi, 2004; Vieira *et al.*, 2008). Os controles negativos, foram o meio de cultura e DMSO a 1%.

4.6.3.2. Avaliação dos resultados

O teste foi realizado em triplicata e a análise dos resultados foi determinada por meio de um microscópio invertido através da observação dos poços da placa. Os movimentos dos parasitos foram estimados de acordo com uma adaptação da avaliação descrita por Weniger *et al.* (2001) e as estimativas foram registrados conforme se segue:

0 = quando 100% dos parasitos estavam em movimento (extrato considerado inativo)

+ = quando havia mais de 50% dos parasitos em movimento (extrato considerado pouco ativo)

++ = quando havia menos de 50% dos parasitos em movimento (extrato considerado ativo)

+++ = quando 100% dos parasitos não apresentaram movimento (extrato considerado muito ativo).

Nesse trabalho foram considerados apenas os extratos inativos (0 = quando 100% dos parasitos estavam em movimento) e os muito ativos (+++ = quando 100% dos parasitos não apresentaram movimento)

4.6.4. Determinação do IC₅₀ dos extratos ativos

4.6.4.1. Procedimento do teste

Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizado o método do MTT, o sal de tetrazolium 3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5 diphenyl tetrazolium bromide (Mosmann, 1983; Vieira *et al.*, 2008)

Para o cálculo do índice de concentração inibitória de 50% dos parasitos a solução estoque dos extratos em DMSO (10 mg/mL) foi diluída em meio na proporção de 1:1 (solução em DMSO: meio), obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL. Assim, em uma placa de cultura de 96 escavações de fundo chato foi adicionado em

cada poço da primeira fileira 192 μL de meio Schneider já suplementado para os testes com *Leishmania* ssp. e 100 μL de meio LIT suplementado para os testes com *T. cruzi*. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 8 μL dos extratos diluídos em meio. Nas fileiras seguintes, foram adicionados 100 μL de meio de cultura de cultura Schneider para os testes com *Leishmania* ssp. e meio LIT para os testes com *T. cruzi*. Dessa forma a primeira fileira ficou com um volume final de 200 μL e todas as outras fileiras com apenas 100 μL . Com o auxílio de uma pipeta multicanal automática regulada para 100 μL foi feita a diluição seriada até a penúltima fileira, desprezando-se, ao final, os 100 μL restantes. Em seguida, adiciona-se a quantidade necessária de μL para a obtenção de 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) amazonensis*, ou 10^6 formas epimastigotas de *T. cruzi*. A última fileira é destinada aos controles do teste. Na figura 32 pode se observar o esquema da diluição seriada. A placa foi incubada por 48 h a 22 $^{\circ}\text{C}$ para os testes com *Leishmania* ssp., e por 72 h a 28 $^{\circ}\text{C}$ para os testes com *T. cruzi*. Após o período de incubação foi realizada a análise de viabilidade dos parasitos.

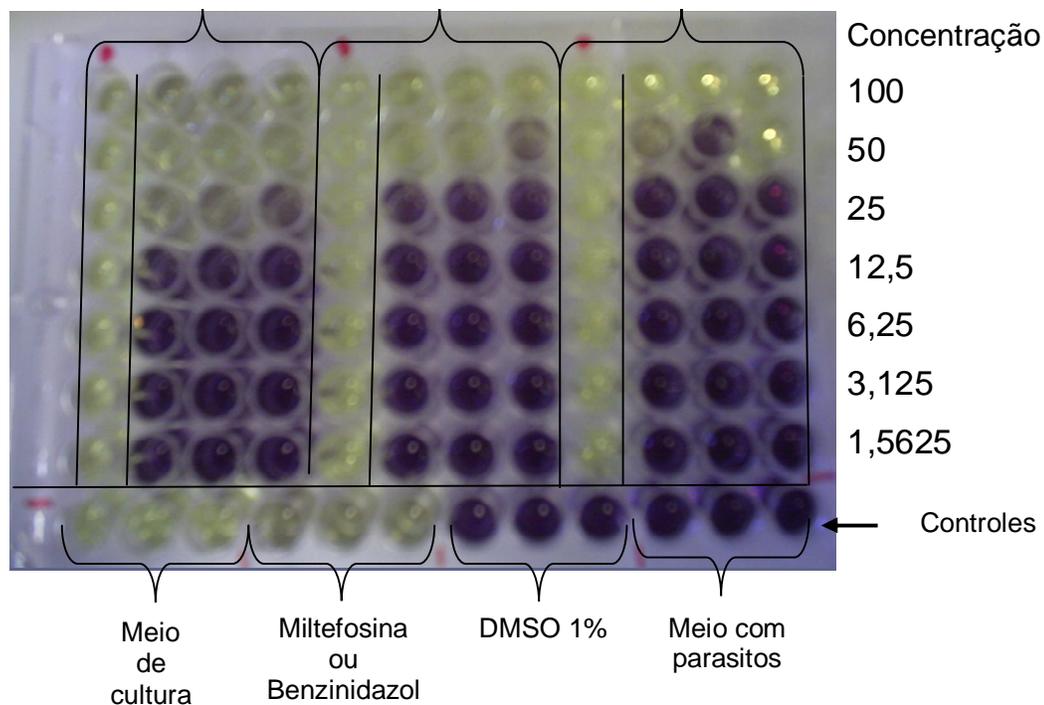


Figura 32 – Esquema da diluição seriada

4.6.4.2. Avaliação dos resultados

Após o período de incubação foi realizada a análise dos parasitos por meio de um microscópio invertido. Em seguida, a análise foi confirmada pelo método do MTT, um método enzimático e colorimétrico quantitativo baseado na capacidade das células metabolicamente ativas de reduzirem o sal (MTT - Sigma[®]), de cor amarelo-ouro, no produto formazan de coloração violácea (Mosmann, 1983). As placas receberam em cada poço 20 µL de uma solução de MTT a 10 mg/mL diluído em PBS (phosphate buffered saline) e a placa foi novamente incubada por 4 h à ± 25 °C. Após esse período, foi utilizado 100 µL de SDS (sulfato dodecil de sódio) a 10% para liberação dos cristais de formazan. A leitura da placa foi feita em leitor de placa de Elisa a 570 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata sendo que a primeira coluna serviu para o controle de cor, caso algum extrato interferisse na coloração do MTT (Figura 32) (McCabe *et al.*, 1994; Camacho *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008).

4.6.5. Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade utilizado foi baseado na técnica clássica do MTT para viabilidade celular e utilizou uma linhagem de células de mamíferos do tipo fibroblastos NIH-3T3 (Mosmann, 1983; Cristovam *et al.*, 2008). Essa linhagem possui um procedimento original de crescimento que consiste em serem transferidas (T) a cada 3 dias e plaqueadas a 300.000 células por placa (de Petri). As culturas são de tecidos ricos em fibroblastos derivados de embriões de camundongos.

Os fibroblastos NIH-3T3 criopreservados foram cultivados em garrafas próprias para o cultivo celular em meio líquido DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado 10% de SFB (v/v). A cultura foi mantida a 37 °C e 5% de CO₂. Para a contagem do número de células existentes nos frascos de cultura foi necessário utilizar uma solução de tripsina. A tripsina é uma enzima proteolítica de origem pancreática que solta as células aderidas ao frasco de cultura. Com o auxílio do microscópio invertido é possível visualizar se as células se soltaram para, então, neutralizar a ação da tripsina com a mesma quantidade de meio de cultura. Em seguida todas as células foram recolhidas em um tubo falcon que foi centrifugado por 3 minutos em baixa rotação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 1 mL de meio DMEM. Para a contagem dos fibro-

blastos foi preparada uma alíquota de 10 µL da suspensão de células em 50 µL de azul de tripan (corante) e com o auxílio da câmara de Neubauer foi realizada a contagem seguindo a fórmula de Freshney (1994). Para o teste foi utilizada a concentração de 8×10^3 células que foram semeadas em placas de 96 poços de fundo chato incubadas *overnight* a 37 °C em 5% de CO₂ por 24 h.

No momento do teste, uma solução de tripsina a 3% foi inserida na garrafa de cultura para soltar as células, já que os fibroblastos são células de aderência. No dia seguinte, o meio foi trocado e as células aderidas ao fundo da placa receberam os extratos ativos diluídos em meio nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 µg/mL. Ao retirar o meio de cada poço, colocou-se imediatamente o meio com o extrato diluído, pois não se pode deixar o poço secar. As células foram então incubadas com os extratos nas diferentes concentrações a 37 °C em 5% de CO₂. Após 24 h, foi avaliada a viabilidade celular pelo teste do MTT (Mosmann, 1983). Um volume de 15 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) foi adicionado a cada poço. Após 3 h de incubação a 37 °C em 5% de CO₂, o meio de cultura foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados, para liberação dos cristais de formazan. A absorbância foi monitorada através de um espectrofotômetro com um leitor de microplacas em um comprimento de onda de 595 nm. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

4.6.6. Atividade dos extratos em formas amastigotas de *Leishmania*

Para o teste com amastigotas o modelo experimental utilizado neste estudo é um dos mais indicados pela literatura (Dube *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2006; Passero *et al.*, 2007).

Para iniciar o teste é necessário obter células de macrófagos. Um volume com 1 mL de tioglicolato 3% foi injetado em camundongos Balb/c. Após 3 dias, esses camundongos tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com 5 mL de meio RPMI (Sigma) para obtenção dos macrófagos peritoneais (figura 33).



Figura 33 – Retirada dos macrófagos peritoneais (a) e recolhidos em tubos falcon (b).

Cerca de 10^5 macrófagos peritoneais foram colocados meio RPMI suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) e 100 μ l dessa suspensão de macrófagos foram semeados sobre lamínulas circulares de vidro no interior de placas de 24 poços incubada *overnight* a 5% de CO_2 em 35 °C para adesão das células. As lamínulas foram lavadas com RPMI-1640 a fim de remover células não aderentes. Em seguida foi adicionado os parasitos promastigotas *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) chagasi* na proporção de 10 parasitos para 1 macrófago. As placas foram incubadas a 5% de CO_2 em 35 °C, para a infecção dos macrófagos. Quatro horas após a infecção, extratos vegetais foram adicionados aos macrófagos infectados nas seguintes concentrações: 100, 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 24 h, as lamínulas foram lavadas com RPMI-1640 e secas com jato de ar e então fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Após secas, as lamínulas foram montadas em lâmina de vidro utilizando a resina de montagem DPX[®] para verificar a contagem de amastigotas nos macrófagos (Figura 34). Para encontrar o percentual de inibição, foi calculada a porcentagem de macrófagos infectados em 100 macrófagos. Cada ensaio foi realizado em triplicata (Dube *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2006).

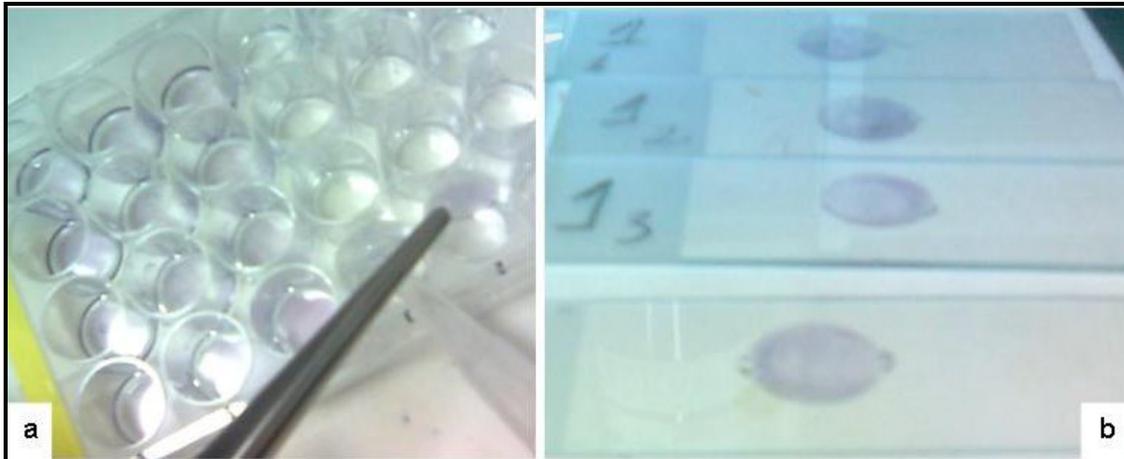


Figura 34 - Placa de 24 poços com as lamínulas já coradas (a) as lamínulas montadas em lâmina de vidro (b).

4.6.7. Atividade dos extratos em fungos patógenos humanos - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de microdiluição avalia e quantifica a atividade antifúngica das amostras e controles determinando a menor concentração capaz de inibir o crescimento do fungo. O teste de microdiluição realizado seguiu o protocolo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), especificamente o protocolo M27-A2 que é utilizado para os testes em leveduras.

4.6.7.1. Preparação das amostras e dos controles

No teste de microdiluição a solução dos extratos brutos diluídos em DMSO à 100 mg/mL é diluída em RPMI, até a obtenção da concentração de 4000 µg/mL, e concentração final de DMSO inferior a 5% (v/v).

Os controles positivos utilizados para os testes com as leveduras são o itraconazol e fluconazol. O itraconazol solúvel em DMSO é preparado a 1600 µg/mL, segundo as normas do CLSI, ou seja, em uma concentração no mínimo 100 vezes maior do que a concentração a ser testada, no caso 16 µg/mL. O fluconazol solúvel em água é preparado a 640 µg/mL, segundo as normas, ou seja, no mínimo 10 vezes a maior concentração a ser testada, no caso 64 µg/mL. A concentração dos controles a serem testadas é produzida por diluição em RPMI. O controle negativo é o meio RPMI a uma concentração de 100%.

4.6.7.2. Preparação do meio de cultura

O meio utilizado é o RPMI 1640 *phenol red* (vermelho de fenol) e sem bicarbonato de sódio. O meio em pó (10 g) é reconstituído em água destilada até a obtenção de um litro. Para tal adiciona-se cerca de 900 mL de água destilada em um béquer de 1000 mL, verte-se o conteúdo do envelope e agita-se com um bastão de vidro até a completa dissolução. Para o ajuste do pH é utilizado o ácido 3-[N-morfolino]-propoanossulfônico (MOPS) 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até pH 7,0, medido com o auxílio de um potenciômetro previamente calibrado.

Esse meio é filtrado em fluxo laminar utilizando-se um sistema de filtração a vácuo com membrana de poro 0,22 µm. Três alíquotas de 3 mL desse meio são colocadas na estufa à 37 °C para controle de esterilidade, permanecendo por 5 dias. Caso o meio fique turvo, este é desprezado, pois a turbidez indica crescimento de microorganismos, caso contrário o meio é liberado para uso. Esse meio pode ser armazenado à 4 °C.

4.6.7.3. Produção do inóculo de leveduras

Para a obtenção do maior número de células viáveis, uma subcultura/repique das leveduras é realizada 48 h antes do teste de determinação da concentração inibitória mínima. No dia do teste, uma pequena alíquota da levedura foi transferida para um tubo de ensaio contendo salina estéril 0,85%, até atingir o grau de turbidez de 0,5 na escala de McFarland (10^6 unidades formadoras de colônias, UFC/mL). Em seguida, essa suspensão foi diluída em RPMI em duas etapas. A primeira corresponde a uma solução 1:100, ou seja, uma parte da suspensão salina para 99 partes de meio RPMI, obtendo-se assim a solução intermediária. Outra diluição foi realizada na proporção de 1:20, obtendo-se o inóculo, que será utilizado no teste, com uma concentração de células variando de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

4.6.7.4. Procedimento do teste de microdiluição

O teste de microdiluição foi realizado em placa estéril de 96 poços de fundo redondo. Inicialmente foram colocados 100 µL de meio RPMI em todos os poços da placa. Em seguida, nos poços da primeira coluna, adicionou-se 100 µL do extrato e dos controles positivos previamente diluídos na concentração de teste. Desse modo, todos os poços da primeira coluna ficaram com um volume de 200 µL. Com o auxílio

de uma pipeta automática com oito canais, regulada para 100 µL, foi feita a diluição seriada até a coluna de número dez, desprezando-se ao final os 100 µL restantes. Em seguida, adicionou-se 100 µL do inóculo em todas as colunas com exceção da coluna doze. Desse modo, a concentração do extrato no primeiro poço era de 1000 µg/mL. A coluna onze correspondeu ao controle negativo, pois continha o meio RPMI e o microorganismo. A coluna doze correspondeu ao controle de esterilidade do meio, pois continha apenas o meio RPMI. As placas foram tampadas e embaladas com filme PVC individualmente. Finalmente, as placas foram incubadas em estufa à 35 °C, por 48 h.

4.6.7.5. Leitura dos resultados da concentração inibitória mínima (CIM)

A leitura foi feita verificando o CIM visualmente através da turbidez do meio, ou seja, verificando a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento do microorganismo. A leitura foi realizada da direita para a esquerda, observando-se o crescimento do fungo no poço. O primeiro poço onde não se observou o crescimento do fungo foi considerado o valor do CIM. Em caso de inibição do crescimento do fungo em todos os poços foi realizado um novo teste começando de uma concentração menor. Os testes foram realizados pelo menos duas vezes em duplicata. Calculou-se, então, a média geométrica dos valores de CIM.

4.7. Teste biológico *in vivo*

4.7.1. Avaliação comportamental do extrato bruto - Teste hipocrático

Foram utilizados 2 camundongos machos e 2 fêmeas, de 20 a 25 g, que receberam doses crescentes (500 a 5000 mg/Kg) por meio de gavagem orogástrica, (v.o.) do extrato bruto previamente selecionado ativo nos testes *in vitro*. Um animal controle foi utilizado para cada dose, recebendo veículo (água) v.o. em um volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal. Os animais foram observados individualmente em gaiolas apropriadas após a administração do extrato nas diferentes concentrações ou apenas da água nos tempos de 0; 5; 10; 15 e 30 min.; 1; 2; 4 e 8 h e, uma vez, a cada dia, por uma semana. As observações seguem alguns parâmetros básicos como: alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade e contorções

abdominais. Os resultados das observações comportamentais gerais foram anotados em tabela adaptada dos trabalhos de Malone, 1977 e 1983 (Anexo II).

4.7.2. Modelo experimental em camundongos infectados com *L. (L.) chagasi*

4.7.2.1. Preparo do inóculo para infecção

A cultura de *L. (L.) chagasi* foi mantida em hamsters infectados. Para o preparo do inóculo foram utilizados os fragmentos de baço e fígado desses hamsters infectados que foram triturados em meio RPMI (SIGMA®), pH 7,2 e a suspensão centrifugada a 42 x g/4 °C/1 min. em tubo falcon de 15 mL. O sobrenadante é recuperado e lavado por duas vezes em solução de PBS 0,1M, pH 7,2 esterilizado. O sobrenadante é centrifugado a 1540 x g/4 °C/10 min. o sedimento final é recuperado e ressuspensionado em RPMI (SIGMA®) pH 7,2 suficiente para a concentração final de 10⁷ parasitos/dose. Para a contagem dessa concentração de parasito é necessária a o auxílio da câmara de Neubauer. Esse inóculo preparado então é injetado via intraperitoneal (Figura 35) em camundongos BALB/c com idade entre 5 e 8 semanas. As etapas que intercalam as centrifugações devem ser realizadas em baixa temperatura e todo o material utilizado é previamente esterilizado.

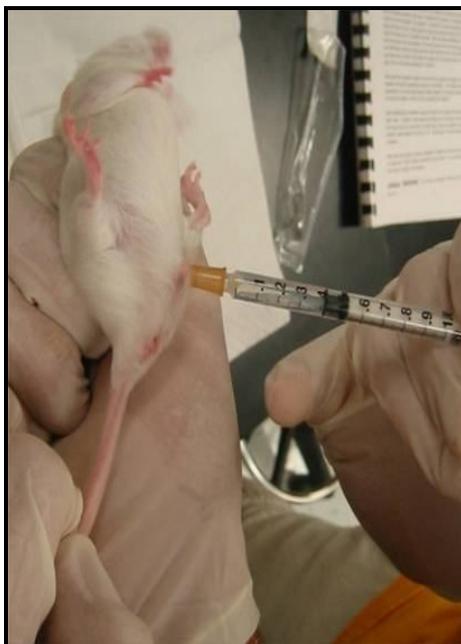


Figura 35 - Injeção intraperitoneal do inóculo *L. (L.) chagasi*.

4.7.2.2. Tratamento

Após 10 dias da inoculação da injeção do inóculo com *L. (L.) chagasi*, um total de 20 animais foi dividido aleatoriamente em grupos de cinco animais. Cada grupo recebeu um tratamento diferente. Os animais foram tratados por via oral por meio de gavagem orogástrica (figura 36) nas doses de 100 e 250 mg/kg, e com miltefosina, medicamento de referência, administrado na dose de 40 mg/kg, além do grupo controle negativo que recebeu apenas água. Os animais receberam uma dose única uma vez por dia durante 10 dias.



Figura 36 - Administração oral (gavagem orogástrica) dos tratamentos com extrato

4.7.2.3. Avaliação da infecção

Após sete dias do término do tratamento os animais foram necropsiados (figura 36), e foi retirado o fígado e o baço para a determinação da carga parasitária dos grupos tratados e dos grupos controle (Lakshmi *et al.*, 2007). Os órgãos foram retirados e lâminas *in print* foram preparadas e coradas com Giemsa. As lâminas foram analisadas com auxílio do microscópio com aumento de 1000X com óleo de imersão. A percentagem de inibição dos parasitos nos animais foi calculada pelo número de células infectadas em cada 100 células, nos grupos controle negativo, positivo e tratados (Silva, 2004).



Figura 37 - Necropsia para retirada do baço e fígado dos animais tratados.

4.8. Métodos cromatográficos

4.8.1. Cromatografia de adsorção

Nas cromatografias de adsorção foi empregada sílica gel 60 (Ultra Chem, 400-200 mesh). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de sílica gel utilizadas (Figura 38a). Para a cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplaças de sílica gel 60 F254 (Merck®) (Figura 38b).

Os eluentes utilizados foram: ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade. O solvente inicial de cada coluna cromatográfica foi previamente determinado, segundo o fator de retenção (Rf) obtido por cromatografia em camada delgada (CCD).

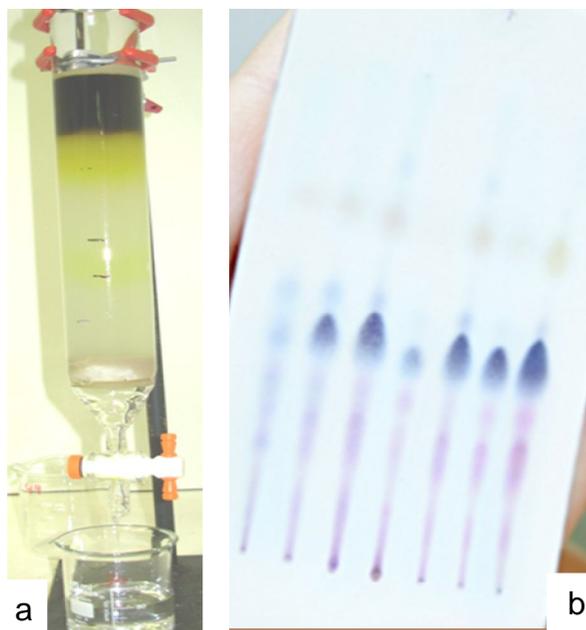


Figura 38 - Cromatografia em coluna aberta (a) e Cromatografia em camada delgada (b).

Para revelação das placas de CCD foi utilizado vanilina sulfúrica. Esse processo consiste em pulverizar a placa de CCD com solução alcoólica de vanilina a 10%, seguida de pulverização com solução aquosa de ácido sulfúrico a 1% e aquecimento da placa a 100 °C.

4.8.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ≈ HPLC)

As soluções de calibração, e frações foram analisadas em um aparelho de HPLC, constituído de uma bomba binária Waters-125 e um detector DAD Waters-2996 a 254 nm. As separações foram efetuadas em coluna X-Terra[®] MS 18 (4,6 X 250 mm, 5 µm), mantidas em um forno termostático a 35 °C. As amostras foram eluídas com utilizando como fase móvel gradientes de hexano e acetato de etila, adotando-se fluxo de 4,72 mL/min. O sistema operou em fase normal (coluna cromatográfica cuja fase estacionária é polar e a fase móvel apolar).

Os solventes empregados apresentavam grau de pureza HPLC e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex) e degaseificados por sonicação a vácuo durante 5 min. As amostras fo-

ram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 μm (Waters).

4.9. Método Espectrométrico - 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 de carbono (RMN ^{13}C), unidimensional, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

O espectrômetro Bruker Avance, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,046 T, foi operado nas frequências de 300,13 e 75,47 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica.

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado: clorofórmio, metanol, dimetilsulfóxido, água ou pirimidina, comercializado pelas empresas: ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich.

Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de prótio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes deuterados utilizados.

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

Nos experimentos unidimensionais de ^1H e ^{13}C foram estabelecidos os seguintes parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, tempo de relaxação de 1s e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Ainda foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento. Já o número de transientes foi de 8 para ^1H e 16384 para ^{13}C .

4.10. Método Físico - Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão, não corrigido, foi determinado em equipamento da Mettler Toledo[®], composto de uma placa aquecedora FP82HT e uma unidade de processamento FP90, a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min.

4.11. Análises estatísticas

Para o cálculo do IC₅₀ foi utilizado o método de regressão linear e não linear, com o auxílio do Software Excel. O resultado do ensaio *in vivo* foi pela média ± EPM. Para as comparações múltiplas de dados, foi utilizada ANOVA (análise de variância), seguido pelo teste t-Student e Newman-Keuls. Um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos pesquisadores têm buscado novas alternativas terapêuticas na natureza (Santos *et al.*, 2008). A análise da atividade biológica de extratos de plantas é uma ferramenta importante na busca de novos compostos com potencial aplicação terapêutica (de Mesquita *et al.*, 2005a; de Mesquita *et al.*, 2005b; Vieira *et al.*, 2008; Gachet *et al.*, 2010; Vendrametto *et al.*, 2010).

Os produtos naturais são estruturas químicas privilegiadas, selecionadas na natureza por pressões exercidas no processo evolutivo. Estes produtos interagem como uma grande variedade de proteínas ou outros alvos moleculares com propósitos específicos. Suas estruturas apresentam grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as tornam favoráveis como compostos líderes para a pesquisa de medicamentos, e que as diferenciam das bibliotecas de compostos sintéticos ou combinatoriais (Koehn e Carter, 2005).

Muitos produtos naturais têm revelado seu potencial antiparasitário em ensaios *in vitro* e representam estruturas líderes interessantes para o desenvolvimento de novos medicamentos para as doenças parasitárias (Kayser *et al.*, 2003).

Entre os medicamentos derivados de compostos medicinais cita-se o arteeter, um agente antimalárico desenvolvido a partir da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) (Chin *et al.*, 2006).

Neste trabalho, diversas plantas do Cerrado brasileiro foram estudadas sobre microorganismos patogênicos na busca por novas substâncias com ação terapêutica. A ordem dos experimentos e a tomada de decisões foram feitas com base no fluxograma observado na figura 39.

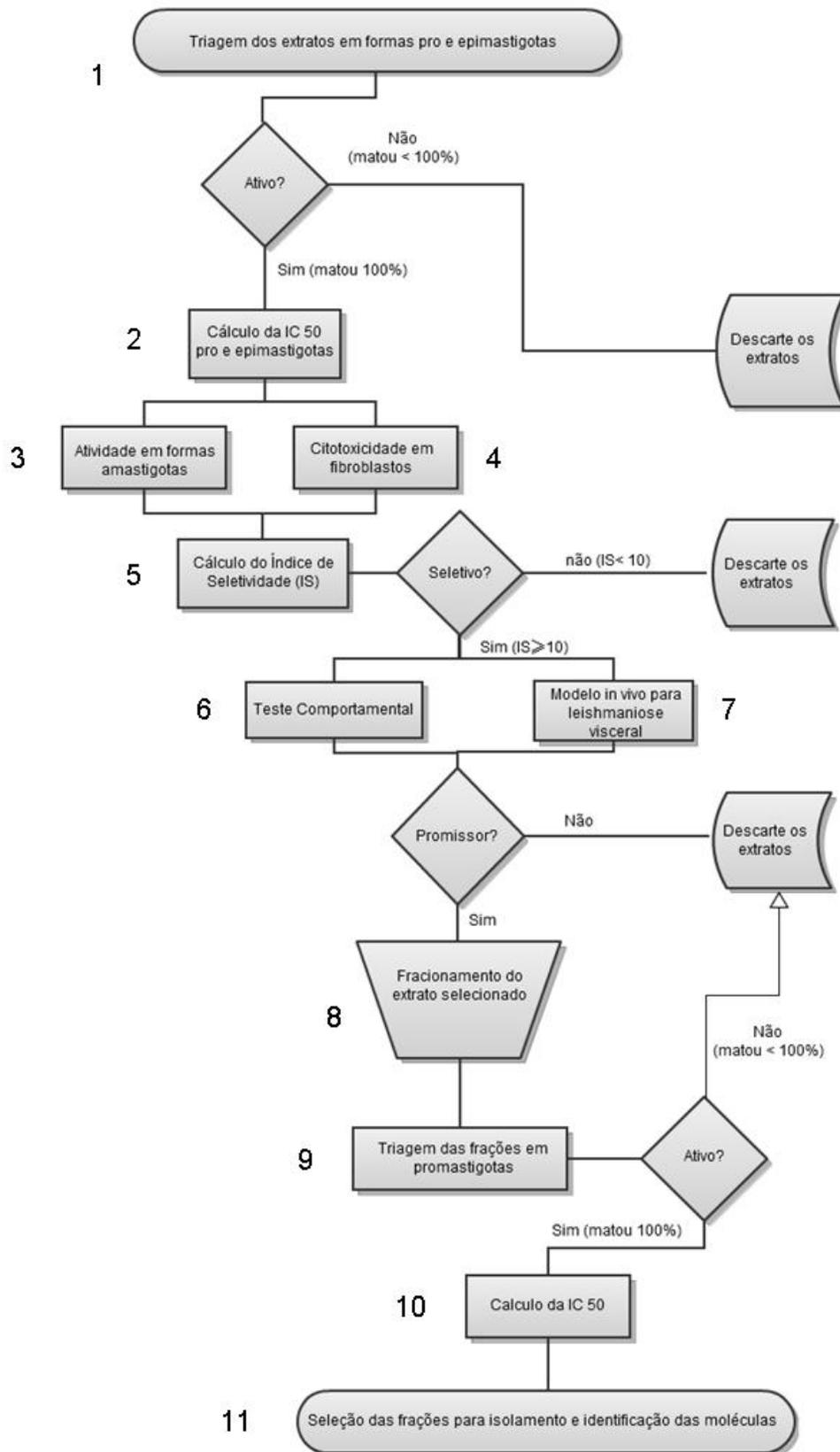


Figura 39 – Fluxograma geral da ordem dos experimentos e a tomada de decisões.

Estudos biológicos *in vitro*

Na primeira etapa do trabalho (fase 1 do fluxograma), 120 extratos oriundos de 26 espécies pertencentes a 16 famílias de plantas do Cerrado (Tabela 3) foram testados *in vitro* em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, e em formas epimastigotas de *T. cruzi* a uma concentração de 100 µg/mL.

Tabela 3- Extratos de plantas do bioma Cerrado avaliados em *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) chagasi* e *Trypanosoma cruzi*.

Família	Espécie	Parte da planta testada (solvente)
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	CC (d), MR (h)
Annonaceae	<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schlttdl.	F (h, e), R (e), CC (h, e), MC (e)
Apocynaceae	<i>Condylocarpon isthmicum</i> (Vell.) A. DC.	F (h, e), MC (h, e), CC (h, e)
	<i>Peschiera affinis</i> Miers	R (h, e), CC (h, e), MC (h, e)
Asteraceae	<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.	F (h, e), CR (h, e), MR (e), CC (h), MC (e)
	<i>Eremanthus sphaerocephalus</i> Baker	F (h, e)
Bignoniaceae	<i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stellfeld	F (h, e), Fr (e), R (e), C (e)
	<i>Anemopaegma chamberlaynii</i> (Sims.) Dur. Ik.	F (d), C (h, d, e)
	<i>Arrabidaea florida</i> DC.	Fr (e), F (h, e)
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> L. Marchand	F (h, e), CR (e), MR (h, e), CC (h, e), MC (e)
	<i>Protium ovatum</i> Engl.	F (h, e), Fr (h, e), C (e), R (h, e), CC (h)
Ebenaceae	<i>Diospyros hispida</i> A. DC.	CC (hs)
Magnoliaceae	<i>Talauma ovata</i> A. St. - Hil.	F (h, e), CC (h, e), MC (e)
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	F (h, hs), CC (h), MC (d), CR (h)
Meliaceae	<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	F (h, e), R (e)
Mimosaceae	<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	F (h, hs), C (hs), MR (hs)
Rubiaceae	<i>Sabicea brasiliensis</i> Wernham	Fr (e)
	<i>Chomelia pohliana</i> Müll. Arg.	F (hs), R (hs)
Sapindaceae	<i>Matayba guianensis</i> Aublet	CC (h, e), CR (e), MR (h), MC (e)
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum soboliferum</i> Rizzini	F (h, e)
	<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F (e), MC (e), R (e), CR (h), MR (h)
	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radek.	F (h, e), CR (h, e), MR (e), CC (h, e), MC (e)
	<i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radek.	F (h, d, e), R (e), MR (e), MC (e)
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aublet	F (h, e), CC (e), MC (e)
(Monimiaceae)	<i>Siparuna cujabana</i> A. DC.	F (h, e), Fr (h, e), R (h, e), C (h, e)
Zingiberaceae	<i>Renealmia alpinia</i> (Rottboell) Maas	F (e), Rz (h, d, a)

F: folhas; Fr: frutos; R: raiz (madeira + casca); CR: casca da raiz; MR: madeira da raiz; Rz: rizoma; C: caule (madeira + casca); CC: casca do caule; CM: madeira do caule. Solventes: h, hexano; d, diclorometano; a, acetato de etila; e, etanol; hs, solução hidroetanólica 90%.

As formas extracelulares dos parasitos *Leishmania* e *Trypanosoma* são mais simples de cultivar e comumente utilizadas em fracionamentos bioguiados de extratos vegetais (Weniger *et al.*, 2001; de Mesquita *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2005; Brenzan *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008a; Sarkar *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Allmendinger *et al.*, 2010), dessa forma são normalmente utilizadas para testes de triagem e neste estudo elas foram escolhidas para os testes preliminares.

Os parasitos *Leishmania* ssp. e *T. cruzi* pertencem à família Trypanosomatidae. Estes gêneros ainda compartilham a expressão de enzimas proteolíticas envolvidas com a diferenciação celular desta família. O parentesco genético dos gêneros também apresenta outras características similares como a presença do mesmo epítipo, que é a parte do antígeno capaz de estimular a resposta imunológica responsável por caracterizar a ocorrência de reações cruzadas nos exames sorológicos. Essas reações são clássicas, principalmente quando são utilizados antígenos não purificados (Brener *et al.*, 2000; Sundar e Rai, 2002; Osorio *et al.*, 2006; Zanoni *et al.*, 2006; Azevedo e Soares, 2009).

Devido a estes fatores genéticos, poderia ser que os parasitos poderiam demonstrar uma resposta parecida quando submetidos à ação dos extratos testados. No entanto, neste trabalho, tais resultados não foram observados e a concentração inibitória da maioria dos extratos foi bem diferente para promastigotas de *Leishmania* e epimastigotas de *Trypanosoma*.

Os extratos foram considerados muito ativos quando matavam 100% dos parasitos na concentração de 100 µg/mL. Essa triagem de atividade permitiu selecionar 14 extratos que foram, então, submetidos ao teste de diluição seriada com sal de tetrazolium (MTT) para calcular o índice de concentração inibitória, ou seja, a concentração capaz de matar 50% dos parasitos (IC₅₀). Esses valores podem ser observados na tabela 4 (fase 2 do fluxograma).

Tabela 4 - Atividade *in vitro* (IC₅₀) de extratos de plantas em promastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, em epimastigotas de *T. cruzi*.

Espécie	Extratos		IC ₅₀ (µg/mL)		
	Parte	Solvente	<i>L. (L.) chagasi</i> Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i> Promastigotas	<i>T. cruzi</i> Epimastigotas
<i>A. chamberlaynii</i>	CC	d	48,6 ± 0,2	>100	>100
<i>G. guidonia</i>	F	h	54,3 ± 0,4	55 ± 0,25	>100
	F	e	50,02 ± 0,5	>100	>100
<i>M. guianensis</i>	CC	h	>100	85,3 ± 0,5	>100
<i>P. ovatum</i>	F	e	>100	>100	63 ± 0,52
<i>P. torta</i>	F	e	58,3 ± 0,43	>100	>100
<i>R. alpinia</i>	Rz	d	44 ± 0,5	>100	50,8 ± 0,26
	Rz	h	22,8 ± 0,2	20 ± 0,1	>100
	Rz	a	18,8 ± 0,2	22 ± 0,3	50,03 ± 0,42
<i>S. cujabana</i>	Fr	h	30 ± 0,3	>100	63,8 ± 0,28
	F	h	30,5 ± 0,4	63 ± 0,32	53 ± 0,38
	C	h	>100	89,3 ± 0,23	>100
<i>S. terebinthifolius</i>	MC	d	45 ± 0,3	20 ± 0,4	47 ± 0,53
<i>T. ovata</i>	CC	h	80,22 ± 0,6	>100	>100
Miltefosina	-	-	2,9 ± 0,4	< 10	-
25 µg/mL					
Benznidazol	-	-	-	-	46 ± 0,6
100 µg/mL					

F: folhas; Fr: frutos; Rz: rizoma; C: caule (madeira + casca); CC: casca do caule; MC: madeira do caule. Solventes: h, hexano; d, diclorometano; a, acetato de etila; e, etanol.

O MTT é um método enzimático e colorimétrico quantitativo baseado na capacidade das células metabolicamente ativas reduzirem o sal 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo, de cor amarelo-ouro, no produto formazan pela enzima hidrogenase succínica presente na mitocôndria das células. Tais células adquirem uma coloração violácea avaliada por espectrofotometria (Mosmann, 1983). Dessa forma o método do MTT é capaz de determinar a quantidade de parasitos viáveis em um sistema (Mossmann, 1983; Gerlier e Thomasset, 1986) e a viabilidade celular de uma forma geral. O método do MTT é consagrado pela literatura para demonstrar a viabilidade celular (Mosmann, 1983; Wilson, 2000).

Após o cálculo de IC₅₀ em formas extracelulares, os extratos selecionados foram testados em formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* (fase 3 do fluxograma) e em fibroblastos de mamífero NIH-3T3 (fase 4 do fluxograma) para avaliação da especificidade de ação (Tabela 5), mensurada pelo índice de seletividade (IS) (fase 5 do fluxograma).

O índice de seletividade (IS) demonstra a relação entre citotoxicidade e atividade biológica (Lenta *et al.*, 2007; de Mesquita *et al.*, 2007). Esse índice, já utilizado por Singh *et al.* (2008a), representa o potencial efetivo das substâncias sobre o parasito em relação à toxicidade. Estudos recentes consideram seguros os extratos com valores de IC₅₀ em células de mamíferos acima de 250 µg/mL (Lenta *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008b) e índice de seletividade maior que 10 (Lenta *et al.*, 2007). Segundo de Mesquita *et al.* (2007), os extratos que demonstram alta seletividade (valores de IS > 10) são potencialmente mais seguros na busca por novas opções terapêuticas.

O estudo com amastigota é o de maior relevância clínica por ser a forma intracelular encontrada em mamíferos. Dessa forma o teste *in vitro* com amastigotas é muito comum em substâncias candidatas a ação antileishmania. Vários são os protocolos preconizados para o teste com leishmania. O modelo utilizado neste estudo é um dos mais indicados pela literatura (Dube *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2006; Passero *et al.*, 2007).

Os fibroblastos são células encontradas no tecido conjuntivo que se proliferam rapidamente e tornam-se o tipo celular predominante. Nesse estudo foram utilizadas as células de fibroblastos da linhagem NIH-3T3. Segundo vários autores (Theiszová *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2008), as linhagens 3T3 são valiosos sistemas para estudos *in vitro* por possuírem alta sensibilidade à inibição.

Os resultados dos testes *in vitro* em formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* não demonstraram uma relação entre os valores de IC₅₀ encontrados sobre cada uma destas formas do parasito. De modo geral, observou-se uma maior atividade dos extratos vegetais para as formas amastigotas das duas espécies de *Leishmania* estudadas.

Por exemplo, para o extrato diclorometânico do rizoma de *R. alpinia*, os valores de IC₅₀ em formas promastigotas e amastigotas foram respectivamente, de 44 e 6,03 µg/mL em *L. (L.) chagasi* e >100 e 11,58 µg/mL em *L. (L.) amazonensis* (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5 - Atividade *in vitro* (IC₅₀) de extratos de plantas em amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* e citotoxicidade em células NIH-3T3.

Espécie	Extratos		IC ₅₀ (µg/mL)				
	Parte	Solvente	<i>L. (L.) chagasi</i>		<i>L. (L.) amazonensis</i>		Células NIH-3T3 Citotoxicidade
			Amastigotas	IS	Amastigotas	IS	
<i>A. chamberlaynii</i>	CC	d	19,44 ± 0,28	10	>100	< 10	194,04 ± 0,17
<i>G. guidonia</i>	F	h	10,68 ± 0,4	14	11,72 ± 0,4	13	149,29 ± 0,31
	F	e	31,41 ± 0,7	< 10	32,81 ± 0,6	< 10	229,78 ± 0,15
<i>M. guianensis</i>	CC	h	>100	< 10	73,18 ± 1,0	< 10	90,10 ± 0,07
<i>P. ovatum</i>	F	e	>100	< 10	>100	< 10	235,32 ± 0,16
<i>P. torta</i>	F	e	8,81 ± 0,9	< 10	20,18 ± 0,3	< 10	75,86 ± 0,25
<i>R. alpinia</i>	Rz	d	6,03 ± 1,0	39	11,58 ± 0,8	20	235,38 ± 0,1
	Rz	h	10,6 ± 0,8	< 10	8,89 ± 1,2	< 10	67,84 ± 0,23
	Rz	a	9,45 ± 0,9	< 10	16,7 ± 1,0	< 10	77,88 ± 0,08
<i>S. cujabana</i>	Fr	h	22 ± 0,49	< 10	16,88 ± 0,7	< 10	116,96 ± 0,25
	F	h	28,63 ± 1,6	13	8,75 ± 0,9	43	378,55 ± 0,11
	C	h	28,63 ± 0,8	< 10	41,27 ± 1,2	< 10	92,95 ± 0,32
<i>S. terebinthifolius</i>	MC	d	55,05 ± 0,5	< 10	>100	< 10	149,29 ± 0,20
<i>T. ovata</i>	CC	h	>100	< 10	45,26 ± 1,5	< 10	361,37 ± 0,22

F: folhas; Fr: frutos; Rz: rizoma; C: caule (madeira + casca); CC: casca do caule; MC: madeira do caule. Solventes: h, hexano; d, diclorometano; a, acetato de etila; e, etanol.

IS: índice de seletividade; razão da taxa de atividade citotóxica em células NIH-3T3 pela atividade em amastigotas.

Avaliando a literatura científica, um resultado semelhante foi descrito para o extrato diclorometânico das folhas de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) em *L. (L.) amazonensis*, com IC₅₀ de 40 e 3,7 µg/mL em promastigotas e amastigotas, respectivamente (Brenzan *et al.*, 2007). Orhan e *et al.* (2006) demonstraram que o óleo essencial das folhas, caule e sementes de *Pistacia vera* (Anacardiaceae) apresentou atividade em forma amastigota de *L. donovani* (2,3 µg/mL), mas não foi ativo para a forma promastigota.

O contrário também pode ser observado em nosso trabalho, onde o extrato diclorometânico da madeira do caule de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), por exemplo, foi mais ativo em formas promastigotas (IC₅₀ = 20 µg/mL) do que amastigotas (IC₅₀ > 100 µg/mL) de *L. (L.) amazonensis*.

Curiosamente, outros autores conseguiram observar uma relação entre as atividades sobre as duas formas do parasito *L. donovani*. O estudo de Sharma *et al.* (2009) avaliou a atividade *in vitro* anti-*Leishmania* de extratos de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas na Índia. Os extratos metanólico da raiz de *Withania somnifera* Duna (Solanaceae) e do bulbo de *Allium sativum* Linn (Lilia-

cerae) apresentaram atividade semelhante para as duas formas de *L. donovani* com IC₅₀ de 78 ± 5 e 89 ± 7 µg/mL para promastigotas e 63 ± 6 e 67 ± 5 µg/mL para formas amastigotas, respectivamente.

No estudo de Singh *et al.* (2008b) também se observa uma relação nos resultados entre as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania donovani* com IC₅₀ de 88,5 ± 8,4 e 72,45 ± 5 µg/mL, respectivamente, para o extrato bruto metanólico da espécie de pepino do mar *Actinopyga lecanora* (Holothuriidae) e suas frações.

Outro ponto interessante observado neste trabalho é que a metade dos extratos ativos são hexânicos, ou seja, apolares, e os outros ativos são de polaridade intermediária. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Billo *et al.* (2005). Os autores realizaram uma triagem de 67 extratos de plantas medicinais da Nova Caledônia e Vanuatu em protozoários e os melhores resultados encontrados foram com os extratos hexânicos e clorofórmicos. Contudo, outros estudos relatam que as maiorias dos extratos com atividade antiprotozoária são de média (diclorometano) a alta polaridade (etanol, metanol) (Weniger *et al.*, 2001; de Mesquita *et al.*, 2005a; Tempone *et al.*, 2005; Nibret *et al.*, 2009).

Depois de avaliar a ação dos 14 extratos selecionados em formas amastigotas de *Leishmania* ssp. e a atividade citotóxica em fibroblastos, suas atividades também foram analisadas em espécies dos fungos *Candida* ssp. e *Cryptococcus* ssp.. Essas leveduras são responsáveis por infecções patogênicas oportunistas importantes em pacientes imunodeprimidos, juntamente com as espécies de *Leishmania* (Pozio, 2004; Reynolds, 2009; Carranza-Tamayo *et al.*, 2009).

Extratos ativos em *Leishmania* e leveduras poderão ser interessantes na pesquisa de compostos líderes para o tratamento destas infecções (Reynolds, 2009). A anfotericina B, por exemplo, é um medicamento comumente usado no tratamento de infecções sistêmicas causadas por leveduras em pacientes imunocomprometidos, e também é considerada uma opção de tratamento para a leishmaniose (Reynolds, 2009; Moen e Lyseng-Williamson, 2009; Sundar *et al.*, 2010) (Tabela 6).

Tabela 6 – Atividade *in vitro* da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de plantas em *Candida* ssp. e *Cryptococcus* ssp.

Espécie	Parte	Solvente	Concentração inibitória mínima (CIM) µg/mL					
			C. a ATCC 10231	C. g LMGO 44	C. k LMGO 174	C. p ATCC 22019	C.g	C.n
<i>A. chamberlaynii</i>	CC	d	>1000	500	>1000	125	500	500
<i>G. guidonia</i>	F	h	250	>1000	< 1,95	>1000	>1000	>1000
	F	e	>1000	>1000	>1000	250	250	31,5
<i>M. guianensis</i>	CC	h	>1000	250	>1000	500	31,5	31,5
<i>P. ovatum</i>	F	e	1000	500	250	125	125	62,5
<i>P. torta</i>	F	e	>1000	500	>1000	500	125	125
<i>R. alpinia</i>	Rz	d	>1000	125	31,5	125	31,5	7,81
	Rz	h	250	250	62,5	500	62,5	31,5
	Rz	a	62,5	125	62,5	500	62,5	62,5
<i>S. kujabana</i>	Fr	h	250	500	31,5	250	125	125
	F	h	31,5	>1000	62,5	>1000	31,5	31,5
	C	h	250	>1000	125	>1000	62,5	62,5
<i>S. terebinthifolius</i>	MC	d	500	62,5	250	62,5	15,62	15,62
<i>T. ovata</i>	CC	h	>1000	250	125	62,5	62,5	31,5
Fluconazol	-	-	1	4	2	0,25	0,5	2
Itraconazol	-	-	1	1	0,125	0,25	8	0,25

Candida albicans C.a., *Candida parapsilosis* C.p., *Candida glabrata* C.g., *Candida krusei* C.k., *Cryptococcus gattii* e Espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans*. F: folhas; Fr: frutos; Rz: rizoma; C: caule (madeira + casca); CC: casca do caule; MC: madeira do caule. Solventes: h, hexano; d, diclorometano; a, acetato de etila; e, etanol.

Para avaliar a atividade dos extratos em fungos patogênicos foi utilizado o valor de concentração inibitória mínima (CIM). Na literatura, não existe um consenso com respeito ao valor de CIM que deve ser considerado como referência para a classificação dos extratos como ativos. Alguns autores consideram um extrato potente quando o valor de CIM é inferior a 1000 µg/mL (Webster *et al.*, 2008) enquanto outros consideram CIM < 500 µg/mL (Algiannis *et al.*, 2001). Neste trabalho os índices foram mais rigorosos, portanto, só foram considerados ativos os extratos com CIM < 125 µg/mL.

Extratos de destaque no estudo

Após os experimentos com as formas extracelular e intracelular de *Leishmania* ssp., a avaliação da citotoxicidade em fibroblastos, o cálculo da seletividade e os testes sobre leveduras com os 14 extratos, dois deles foram destacados: o extrato diclorometânico do rizoma de *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) e o extrato hexânico da folha de *Siparuna kujabana*

(Siparunaceae) (Tabela 4, 5 e 6). Estes extratos apresentaram atividade promissora nas diferentes formas dos parasitos e leveduras avaliados e não demonstraram toxicidade importante em células de mamíferos.

Renealmia alpinia

O extrato diclorometânico do rizoma de *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) apresentou IC₅₀ de 6,03 e 11,58 µg/mL e o extrato hexânico apresentou IC₅₀ de 10,6 e 8,89 µg/mL para formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente. Esse resultado é semelhante ao encontrado nos estudos de Céline *et al.* (2009) que encontrou IC₅₀ < 10 µg/mL para *L. (L.) amazonensis* com extrato etanólico do rizoma de *R. alpinia*. Nas células de mamíferos, o extrato diclorometânico de *R. alpinia* apresentou IC₅₀ de 235,38 µg/mL, com índice de seletividade de 39 para *L. (L.) chagasi* (Tabela 3).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que o extrato etanólico das folhas de *R. alpinia* apresentou IC₅₀ > 200 µg/mL no teste de citotoxicidade em fibroblastos Wish, porém não foi ativo em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O mesmo estudo mostrou que o extrato hexânico das folhas e pseudocaules de *R. alpinia* apresentou IC₅₀ de 40,58 µg/mL em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Vieira *et al.*, 2006; Marchese, 2009).

É interessante observar que o extrato diclorometânico do rizoma de *R. alpinia* apresentou atividade para as formas epimastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ = 50 µg/mL) próxima à atividade do benznidazol (IC₅₀ = 46 µg/mL) que é o medicamento referência utilizado para o tratamento da doença de Chagas (Lirussi, 2004; Urbina, 2009).

Este extrato apresentou ainda um CIM de 7,81 µg/mL para *Cryptococcus neoformans*. O extrato diclorometânico do rizoma de *R. alpinia* foi ativo em leveduras: *Candida krusei* LMGO 174 (CIM de 31,5 µg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* LMGO 44 (ambos com CIM de 125 µg/mL) e em *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (CIM de 31,5 µg/mL) e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (CIM de 7,81 µg/mL).

Estudos anteriores do nosso grupo também demonstraram que o extrato hexânico das folhas de *R. alpinia* apresentou atividade para *Candida albicans*, uma levedura e *Trichophyton rubrum*, um fungo filamentoso, com concentra-

ções inibitórias mínimas de 170,39 e 23,23 µg/mL, respectivamente (Melo e Silva *et al.*, 2009). Zhou *et al.*, 1997 mostrou atividade de dois diterpenos labdanos extraídos das folhas de *R. alpinia* com atividade para o fungo *Saccharomyces cerevisiae* com IC₁₂ de 590 µg/mL.

Siparuna cujabana

Neste trabalho, o extrato hexânico das folhas de *Siparuna cujabana* (Siparunaceae) apresentou valor de IC₅₀ de 30,5 µg/mL em formas promastigotas e 28,63 µg/mL em formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*, e IC₅₀ de 63 µg/mL em promastigotas e 8,75 µg/mL em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O extrato foi também ativo em *T. cruzi* com IC₅₀ de 53 µg/mL. O extrato não apresentou efeitos tóxicos em células de mamífero com valor de IC₅₀ de 378,55 µg/mL para NIH-3T3. Os índices de seletividade (IS) relativos as formas amastigotas foram de 13 e 43, respectivamente (Tabela 3).

Esse extrato também foi ativo em *Candida albicans* ATCC 10231, com valor de CIM de 31,25 µg/mL, *Candida krusei* LMGO 174, com CIM de 62,5 µg/mL e em *Cryptococcus gattii* e espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, ambos com CIM de 31,25 µg/mL.

Apesar do grande número de espécies classificadas, o gênero *Siparuna* (Cronquist, 1981; Renner e Hausner, 1997) ainda não apresenta muitos estudos químicos e farmacológicos (Valverde *et al.*, 1996; Jenett-Siems *et al.*, 2000; Jenett-Siems *et al.*, 2003, Céline *et al.*, 2009) principalmente com a espécie *S. cujabana*.

Entretanto, outras espécies do gênero apresentam relatos de atividade antimicrobiana realizada por Jenett-Siems *et al.* (2000 e 2003). A investigação fitoquímica das folhas de *S. pauciflora* revelou três novos sesquiterpenos com novo esqueleto carbônico: germacrano sipaucina A, elemeno sipaucina B e sipaucina C. E ainda quatro alcalóides aporfínicos já conhecidos: nor-boldina, boldina, laurotetanina e N-methyl-laurotetanina. Estes compostos foram avaliados em duas cepas de *Plasmodium falciparum* (Pow e DD2). Apenas o composto nor-boldina mostrou atividade com valores de IC₅₀ de 3,1 µg/mL (Pow) e 5,4 µg/mL (DD2), sendo, portanto, os demais compostos inativos (Jenett-Siems *et al.*, 2000 e 2003).

O extrato etanólico de *S. aspera* foi testado para *L. (L.) amazonensis* e *Plasmodium falciparum* e foi ativo apenas para o *Plasmodium* com $IC_{50} < 10$ $\mu\text{g/mL}$ (Céline *et al.*, 2009).

O extrato de folhas de *S. andina*, *S. pauciflora*, *S. tonduziana* se mostraram ativos em duas cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* com IC_{50} variando entre 3,0 e 18,3 $\mu\text{g/mL}$ (Jenett-Siems *et al.*, 2000).

O extrato alcaloídico das folhas de *S. guianensis* mostrou atividade sobre a cepa cloroquina resistente de *Plasmodium falciparum* (K1) com $IC_{50} = 6,7$ $\mu\text{g/mL}$ (Fischer *et al.*, 2004).

O extrato de folhas de *S. arianae* mostrou atividade para *Mycobacterium malmoense* com um CIM de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Fonseca *et al.*, 2008).

Outros extratos também se destacaram por apresentarem uma atividade específica importante sobre um ou outro parasito testado. Entre estes, o extrato diclorometânico da casca do caule de *Anemopaegma chamberlaynii*, o extrato hexânico das folhas de *Guarea guidonia*, o extrato hexânico da casca do caule da espécie *Matayba guianensis*, o extrato etanólico da folha de *Protium ovatum*, o extrato etanólico das folhas de *Pouteria torta* e o extrato diclorometânico da madeira do caule de *Schinus terebinthifolius*.

Anemopaegma chamberlaynii

O extrato diclorometânico da casca do caule de *Anemopaegma chamberlaynii* (Bignoniaceae) apresentou atividade em *L. (L.) chagasi* com IC_{50} de 48,6 e 19,44 $\mu\text{g/mL}$ para promastigotas e amastigotas, respectivamente, e um IC_{50} de 194,04 $\mu\text{g/mL}$ para as células de mamífero com um índice de seletividade igual a 10 (Tabela 5). Para o teste de microdiluição, esse extrato foi considerado mais ativo em *Candida parapsilosis* ATCC 22019, com valor de CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

A espécie *Anemopaegma chamberlaynii* é pouco estudada quanto à sua atividade biológica. Não existem relatos na literatura de atividade antiparasitária com extratos dessa espécie e os poucos estudos encontrados se referem aos aspectos botânicos ou ensaios de germinação (Scudeller, 2004; Correia *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2009).

Entretanto, estudos biológicos com outras espécies do gênero *Anemopaegma* já foram relatados. Por exemplo, o estudo de Costa (2007) mostrou ativi-

dade antimicrobiana de extratos metanólicos de raízes e folhas da *A. arvense*, inibindo a *Escherichia coli*, uma bactéria Gram negativa, e duas linhagens de fungos filamentosos da espécie *Trichophyton rubrum* (H6 EAD e TruMDR2 mutante) com valor de CIM de 5 µg/mL.

Guarea guidonia

O extrato hexânico das folhas de *Guarea guidonia* (Meliaceae) apresentou atividade em formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* com IC₅₀ de 10,68 e 11,72 µg/mL, porém os índices de seletividade foram de 14 e 13 respectivamente, com IC₅₀ de 149,29 µg/mL em linhagem de fibroblastos (Tabela 5). Esse mesmo extrato apresentou excelente resultado para a levedura *Candida krusei* LMG0 174 com CIM < 1,95 µg/mL (Tabela 6).

Outros estudos mostraram que o óleo volátil bruto das folhas de *G. guidonia* mostrou moderada atividade antifúngica (inibição de 60%) para *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (Rahalison *et al.*, 1993).

Weniger *et al.* (2001) mostraram atividade antiprotozoária do extrato diclorometânico das sementes de *G. guidonia* para *Plasmodium falciparum* com valor de IC₅₀ de 10 µg/mL e IC₅₀ de citotoxicidade de 28,8 µg/mL para as células de mamífero U 937. Com estes valores, o índice de seletividade do extrato foi de 2,9. Isto demonstra uma baixa seletividade em relação à atividade antiprotozoária. Este resultado diferiu amplamente do resultado encontrado em nosso estudo onde o índice de seletividade foi 14 e 13.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o extrato hexânico de raiz de *G. guidonea* apresentou atividade inseticida para o vetor *Rhodnius milesi*, um dos transmissores da doença de Chagas. A administração tópica de 50 µg do extrato nos tergitos abdominais de ninfas do vetor causou a mortalidade de 75% dos insetos (Coelho *et al.*, 2006).

Matayba guianensis

O extrato hexânico da casca do caule da espécie *Matayba guianensis* (Sapindaceae) já havia sido estudado pelo nosso laboratório em formas amastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. (L.) donovani* apresentando IC₅₀ de 14,8 e 10,7 µg/mL respectivamente (de Mesquita *et al.*, 2005a). Em outro estu-

do, também do nosso grupo de pesquisa, o extrato hexânico da casca da raiz de *Matayba guianensis* revelou atividade *in vitro* para a linhagem de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (FcB1) com $IC_{50} = 6,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ e uma boa seletividade para o parasito em relação às células de mamíferos. O extrato foi testado para duas linhagens de células de mamífero, L-6 e MRC-5, com índices de seletividade de 10 e 16,4, respectivamente (de Mesquita *et al.*, 2005a; de Mesquita *et al.*, 2007). Desse extrato foram isolados 4 compostos éter diglicosídeos também ativos para o *P. falciparum* cloroquina resistente com valores de IC_{50} entre 2,5 e 8,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (de Mesquita *et al.*, 2005a).

Neste estudo, o extrato hexânico da casca do caule da espécie *Matayba guianensis* apresentou IC_{50} de 85,3 e 73,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 3); e atividade em *Cryptococcus gattii* e espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* com CIM de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 6). No estudo de Souza (2006), a fração clorofórmica do extrato de cascas do caule de *M. elaeagnoides* apresentou atividade para o fungo dermatófito *Microsporum gypseum* na concentração de 125 mg/mL .

Protium ovatum

O extrato etanólico da folha de *Protium ovatum* (Burseraceae) avaliado em parasitos demonstrou-se ativo exclusivamente em formas epimastigotas de *T. cruzi* com IC_{50} de 63 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e apresentou valor de IC_{50} de 235,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em células NIH-3T3. Em leveduras, esse extrato apresentou o melhor resultado para espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* com CIM de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 6). Esses resultados são inéditos, pois não há relatos de atividade contra microorganismos para a espécie *Protium ovatum*.

Um dos relatos com atividade antiparasitária de *Protium* foi com o extrato diclorometânico dos frutos de *P. amplum* avaliado em 2 cepas de *Plasmodium falciparum* (F32 e D2) com resultados de IC_{50} de 32 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (Weniger *et al.*, 2001)

Segundo a literatura, as resinas do gênero *Protium* são amplamente utilizadas na medicina tradicional, como por exemplo, para curar feridas, como analgésico e anti-séptico. Elas são também utilizadas em cosméticos, perfumes e alimentos na região da Amazônia (Rüdiger *et al.*, 2009). Também há relatos de ensaios biológicos com espécies do gênero *Protium* e suas resinas demons-

trando potente atividade antiinflamatória (Siani *et al.*, 1999; Aragão *et al.*, 2007; Holanda *et al.*, 2008).

Pouteria torta

A *Pouteria torta* (Sapotaceae) foi uma planta selecionada pelo método etnofarmacológico devido à sua utilização no tratamento de disenterias e infecções bacterianas e fúngicas (Boleti *et al.*, 2008). Neste trabalho, o extrato etanólico das folhas de *P. torta* apresentou CIM de 125 µg/mL em *Cryptococcus* spp. (Tabela 6), e IC₅₀ de 75,86 µg/mL para as células NIH-3T3. Este valor de IC₅₀ em células de mamíferos alerta para possíveis riscos de toxicidade considerando que as folhas desta espécie são geralmente manipuladas com álcool, veículo mais comum em preparações tradicionais.

Em outro trabalho do nosso grupo, os extratos diclorometânico das folhas, etanólico da casca do caule e hexânico da madeira da raiz de *P. torta* foram avaliados em *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*, mas não apresentaram atividade (Melo e Silva *et al.*, 2009).

Segundo Boleti *et al.* (2007), as sementes de *P. torta* têm grande quantidade da proteína pouterina que possui atividade fungicida e inseticida. Em 2009, Boleti *et al.* demonstraram que a pouterina é um potente indutor de apoptose e tóxica para as células tumorais. Em Agripino *et al.* (2004), a pouterina inibiu o crescimento de dois fungos fitopatogênicos com 85% de inibição para o *Fusarium oxysporum* e 54% para *Colletotrichum musae*, além disso, inibiu em 100% o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Schinus terebinthifolius

Neste trabalho, o extrato diclorometânico da madeira do caule de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) foi ativo em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com IC₅₀ = 20 µg/mL e para promastigotas de *L. (L.) chagasi* com IC₅₀ = 45 µg/mL (Tabela 5). Braga *et al.* (2007) testou o extrato metanólico da folha desta mesma espécie e demonstrou atividade para as formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* com IC₅₀ = 55 µg/mL, mas não encontrou atividade para promastigotas de *L. (L.) chagasi* (com IC₅₀ > 250 µg/mL).

O gênero *Schinus* também apresenta relatos na literatura de atividade antimicrobiana. O extrato da casca do caule de *S. terebinthifolius* mostrou forte

inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente com CIM \leq 100 $\mu\text{g/mL}$. Esta atividade mostrou uma boa correlação com o uso tradicional desta espécie. Em outro estudo, o extrato aquoso das folhas e partes aéreas de *S. terebinthifolius* apresentou atividade para *Candida albicans* com halo de inibição de 15 mm e CIM de 120 ng/mL (Schmourlo *et al.*, 2005).

Neste trabalho, o extrato diclorometânico da madeira do caule de *S. terebinthifolius* mostrou-se ativo para as duas espécies de *Cryptococcus* com CIM de 15,62 $\mu\text{g/mL}$, e para *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* LMGO 44 ambas com valor de CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

A literatura descreve que o extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* foi ativo para *Candida glabrata* com MIC de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Johann *et al.*, 2007). Em outro estudo com o mesmo extrato houve inibição em *C. albicans* com halo de inibição de 15 mm e *C. neoformans* com halo de inibição de 20 mm (Braga *et al.*, 2007).

Ainda com o extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* foi possível observar a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* com halo de inibição de 23,8 mm, *Pseudomonas aeruginosa* com halo de inibição de 24,3 mm e *Candida albicans* com halo de inibição de 25,3 mm (Martinez *et al.*, 1996; Guerra *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo*

Após a finalização dos testes biológicos *in vitro*, os resultados foram avaliados no intuito de selecionar um ou dois extratos promissores para dar seguimento aos estudos *in vivo*. Assim, a partir da análise dos resultados e da pesquisa bibliográfica, o extrato hexânico de folhas de *Siparuna cujabana* e o extrato diclorometânico dos rizomas de *Renealmia alpinia* foram selecionados. Os estudos foram iniciados com o extrato hexânico de folhas de *Siparuna cujabana* (etapas 6 e 7 do fluxograma).

A primeira etapa foi a realização de um teste de avaliação comportamental com o extrato (fase 6 do fluxograma). O ensaio mostrou que o tratamento oral dos camundongos com 500 mg/Kg v.o. não resultou em quaisquer mudanças comportamentais. Já na dose de 1000 mg/Kg v.o., verificou-se aumento da motilidade e discreto aumento da frequência respiratória. Tais efeitos tiveram início aos 15 minutos após a administração perdurando por 1 h (Tabela 7).

As doses de 3000 e 5000 mg/Kg v.o. foram seguidas de moderado aumento da motilidade, acrescido de maior aumento da frequência respiratória. Na dose mais elevada, os efeitos foram observados com mais intensidade. Os efeitos iniciaram logo após a administração perdurando na maior dose por 1 hora.

Nenhuma das doses utilizadas do extrato levou os camundongos à óbito. A administração oral do veículo não causou alterações comportamentais gerais nos camundongos durante os 7 dias de observação (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeitos da administração oral do extrato hexânico da folha de *S. cujabana* sobre as atividades comportamentais gerais, em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg,v.o.)	Efeitos Comportamentais
Veículo	-	Sem alterações
	500	Sem alterações
	1000	Verificou-se aumento da motilidade e discreto aumento da frequência respiratória
Extrato de <i>S. cujabana</i>	3000	Moderado aumento da motilidade, acrescido de maior aumento da frequência respiratória
	5000	Maior intensidade dos efeitos anteriores

O teste comportamental fornece uma avaliação preliminar qualitativa e semiquantitativa dos efeitos e alterações comportamentais manifestados em animais a doses crescentes de uma determinada amostra (Santos *et al.*, 2009). Além disso, fornece parâmetros para o estabelecimento das doses que poderão ser utilizadas nos ensaios de toxicidade, aguda e subcrônica, assim como para os ensaios farmacológicos específicos (Sousa *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009).

Diante destes resultados, o extrato hexânico da folha de *S. cujabana* foi avaliado em modelo experimental *in vivo* de leishmaniose visceral (fase 7 do fluxograma).

Para a realização de estudos *in vivo* de leishmaniose visceral é importante uma infecção experimental eficiente para a visceralização da *L. (L.) chagasi*. Em vários estudos encontrados na literatura, a via de infecção utilizada em modelos experimentais de leishmaniose visceral é a via endovenosa com alta concentração de parasitos promastigotas. A justificativa dos autores para essa escolha é a dificuldade de visceralização (Silva, 2004). Entretanto, em

nosso estudo, a infecção experimental por via intravenosa nos camundongos BALB/c não foi eficiente e os animais sempre apresentavam uma baixa carga parasitária no fígado e no baço. Isso tornava a contagem dos parasitos inviável, impossibilitando a determinação do grau de infecção.

Muitos parâmetros estão envolvidos na infecção experimental, por exemplo, a dose do inóculo, a via de infecção, a cepa de *Leishmania* e o estágio evolutivo do parasito. Todos esses fatores foram levados em conta para solucionar o problema da baixa parasitemia na infecção experimental (Fournet *et al.*, 1993; Silva, 2004; Nakayama *et al.*, 2005).

Em relação à escolha do tipo de inóculo, muitos estudos utilizam as formas promastigotas, de cultivo mais fácil, (Silva, 2004) apesar da maior infectividade das formas amastigotas (Silva, 2004). Entretanto, em nosso estudo, considerou-se a hipótese que a utilização de uma alta carga parasitária do inóculo, constituído de formas de baixa infectividade, poderia desencadear uma antígenemia. Essa resposta imune gerada poderia explicar o discreto número de parasitos encontrado (Badaró *et al.*, 1996; Fichoux *et al.*, 1998).

Este efeito parece ter ocorrido no estudo de Melby *et al.* (2001). Os animais foram capazes de amenizar a progressão da infecção por *Leishmania (L.) chagasi*, promovendo, espontaneamente, a diminuição da carga parasitária. O autor sugeriu que este resultado estava relacionado à resposta imunológica. O animal desencadeou a antígenemia do inóculo como uma conseqüência à dose elevada de parasitos recebida e devido à baixa infectividade da forma promastigota (Melby *et al.*, 2001)

Estudos acerca da utilização da via de infecção intraperitoneal demonstraram que esta induz com maior freqüência a formação de metástases em infecções com amastigotas de *L. (L.) chagasi* (Mello, 1980; Melby *et al.*, 2001; Cerqueira *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2003).

Assim, o modelo experimental em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) chagasi* validado nesse estudo utilizou a via intraperitoneal no lugar da via de infecção intravenosa com inóculo de formas amastigotas (10^7 parasitos/dose) ao invés de promastigotas (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008a).

No experimento, os camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) chagasi* receberam o extrato hexânico da folha de *S. cujabana* como tratamento nas doses de 100 e 250 mg/Kg durante 10 dias. Ao final do estudo, observou-se um

percentual de inibição dos parasitos dose-dependente de 52,5% para a menor dose e de 71,2% para a maior. A miltefosina, medicamento referência na dose de 40 mg/Kg, apresentou 81,6% de inibição (Figura 40).

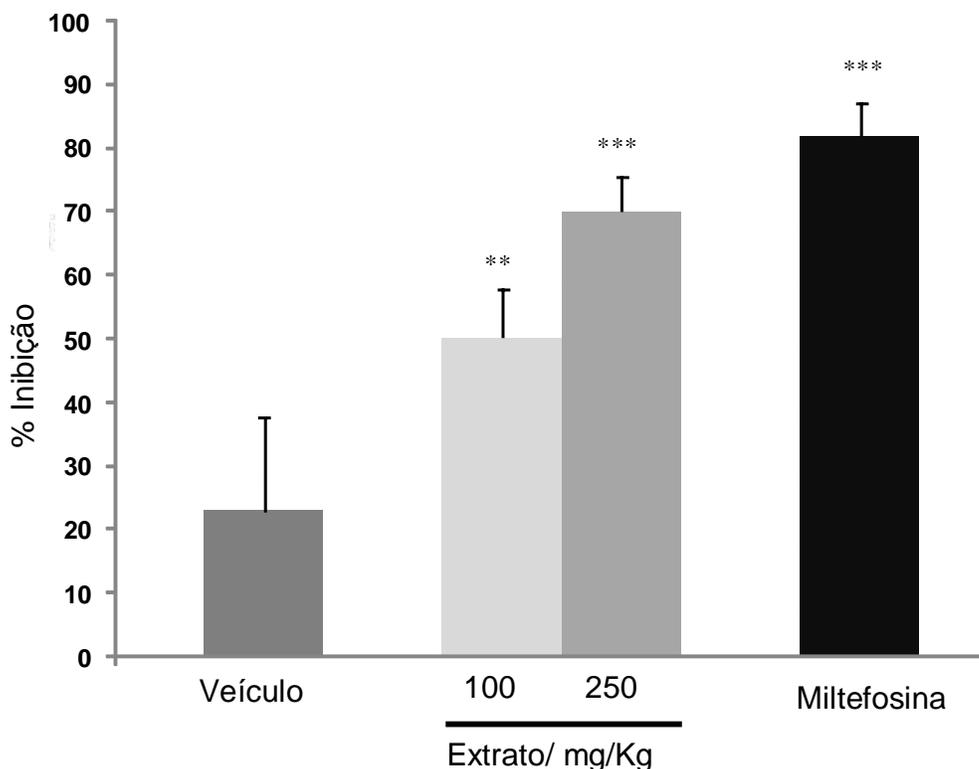


Figura 40 - Efeito do extrato hexânico das folhas de *S. cujabana* em camundongos Balb-c infectados com *L. (L.) chagasi*. Efeito da administração oral do veículo, extrato hexânico das folhas de *S. cujabana* nas doses de 100 mg/Kg e 250 mg/Kg e o medicamento referência, Miltefosina 40 mg/kg. Cada coluna representa a média de 5 animais por grupo. As linhas verticais representam o E.P.M. ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo.

Os resultados do teste *in vivo* corroboraram com os encontrados nos ensaios *in vitro*, ou seja, o extrato hexânico das folhas de *Siparuna cujabana* foi ativo para formas promastigotas e amastigotas e também reduziu significativamente a carga parasitária nos animais tratados. O valor de redução da carga parasitária na dose de 250 mg/kg pode ser comparado ao encontrado por Singh *et al.* (2008a), quando testaram a fração butanólica de *Tinospora sinensis* (Menispermaceae) em hamsters infectados com *L. donovani* resultando em inibição de 72,8%.

Gupta *et al.* (2010) testaram o extrato aquoso dos frutos de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) em modelo experimental de leishmaniose visceral com hamsters infectados por *L. donovani*. A carga parasitária esplênica foi determinada nas doses de 50, 100, 200 e 300 mg/kg de peso corporal do extrato bruto. Ao avaliar as lâminas, os parasitos não foram detectados, o que indicou uma alta eficácia do extrato.

Em outro estudo, o extrato metanólico de folhas de *Maesa balansae* (Myrsinaceae) foi avaliado em modelo experimental em BALB/c infectado com *L. donovani*. A administração de uma dose única subcutânea de 0,4 mg/kg, 1 dia após a infecção, reduziu a carga no fígado em cerca de 95% em todos os animais tratados. Quando o tratamento foi realizado no 14º dia após a infecção, uma dose de 1,6 mg/kg foi necessária para manter o mesmo nível de atividade (Maes *et al.*, 2004).

O extrato metanólico do pepino do mar *Actinopyga lecanora* foi testado *in vivo* em hamsters infectados com *L. donovani*. O tratamento por 5 dias consecutivos acarretou na redução da carga parasitária de 69,4% e 32,1% nas doses de 500 e 250 mg/Kg respectivamente. A fração butanólica desse extrato mostrou resultado semelhante ao do extrato bruto, enquanto a fração acetato de etila foi totalmente inativa. Dois compostos foram isolados da fração butanólica, a holothurina A, que inibiu a carga parasitária em 44,6% na concentração de 100 mg/Kg e a holothurina B, que inibiu 71,5% da carga parasitária na dose de 50 mg/Kg (Singh *et al.*, 2008b).

A atividade de um novo análogo da 2- nitrilquinoleína foi avaliada *in vivo* em modelo de *L. donovani* em camundongos Balb-c e os tratamentos por via oral com 12,5 e 25 mg/kg durante 10 dias consecutivos reduziram a carga parasitária no fígado em 68,9% e 68,5%, respectivamente (Nakayama *et al.*, 2007). Esta atividade foi similar à encontrada em nosso estudo mesmo com doses maiores (100 e 250 mg/kg), o que mostra a potencialidade do extrato hexânico da folha de *Siparuna cujabana* na busca de moléculas promissoras para o tratamento da leishmaniose.

Fracionamento bioguiado

Como os percentuais de inibição da carga parasitária do extrato hexânico de folhas de *S. cujabana* foram elevados, 16 g do extrato foram submetidos ao fracionamento cromatográfico em coluna aberta de sílica (fase 8 do fluxograma). Isto possibilitou o recolhimento de 104 frações de 125 mL (cada) que foram submetidas à análise comparativa por CCD e reunidas em 17 grupos (G1 a G17) de acordo com suas semelhanças (Tabela 7).

O rendimento total dos grupos obtidos foi em torno de 98,7%, ou seja, praticamente não houve perda durante o fracionamento. O grupo G7 apresentou o maior rendimento, em torno de 27,25%, enquanto o grupo G11 apresentou o menor, 0,63% em relação ao extrato bruto.

Os 17 grupos obtidos foram avaliados quanto à atividade em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (fase 9 do fluxograma) e os resultados podem ser contemplados na Tabela 6. Os grupos G8, G9, G10 e G12 foram muito ativos na concentração de 100 µg/mL e, portanto, foram submetidos ao teste de diluição seriada para cálculo do IC₅₀ (Tabela 7) (fase 10 do fluxograma). Esses grupos apresentam os seguintes valores de IC₅₀: G8 = 22,3 µg/mL (correspondendo a melhor atividade); G9 = 60,3 µg/mL; G10 = 89,3 µg/mL e G12 = 78,9 µg/mL. O IC₅₀ encontrado para o G8 foi inferior ao encontrado para o extrato bruto IC₅₀ = 30,5 mg/mL.

Depois, os grupos ativos (G8, G9, G10 e G12) foram fracionados para continuidade do isolamento das substâncias ativas. Cada um destes grupos gerou 4 frações: ciclohexano (Fr1), clorofórmio (Fr2), acetato de etila (Fr3) e metanol (Fr4) (Tabela 8). Dentre os grupos, o menor rendimento das frações foi em G9 (87,15%) e maior em G12 (97,6%) (Tabela 8).

Tabela 8 – Atividade dos grupos oriundo do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de folha de *Siparuna cujabana* em *L. (L.) chagasi* à 100 µg/mL e o valor de IC₅₀ em µg/mL.

Grupo	Fração	Eluente	Massa g	Rendimento %	Atividade 100 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
G						
G1	1	Ciclohexano	0,82	5,13	0	-
G2	2	Ciclohexano	0,52	3,25	0	-
G3	3	Ciclohexano	0,32	2,00	0	-
G4	4-7	Ciclohexano	1,03	6,40	+	-
G5	8-17	Ciclohexano	0,3	1,87	++	-
G6	18- 31	Ciclohexano	0,62	3,87	+	-
G7	32-35	Clorofórmio	4,36	27,25	++	-
G8	36-44	Clorofórmio	1,05	6,56	+++	22,3
G9	45-51	Clorofórmio	1,02	6,37	+++	60,3
G10	52-69	Clorofórmio	1,20	7,50	+++	89,3
G11	70-71	Clorofórmio	0,10	0,63	+	-
G12	72-80	Acetato de etila	2,50	15,62	+++	78,9
G13	81-87	Acetato de etila	0,20	1,25	++	-
G14	88-97	Acetato de etila	0,20	1,25	++	-
G15	98	Metanol	1,21	7,56	+	-
G16	99	Metanol	0,20	1,25	+	-
G17	100-104	Metanol	0,16	1,00	0	-

- não testado, 0 Inativo, +pouco ativo, ++ ativo, +++ muito ativo

As frações ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, pertencentes a cada grupo fracionado (G8, G9, G10 e G12), foram avaliadas na concentração de 100 µg/mL em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (fase 10 do fluxograma). Os resultados podem ser observados na tabela 9.

As quatro frações obtidas a partir do grupo G8 foram muito ativas na concentração de 100 µg/mL em *L. (L.) chagasi* (fase 9 do fluxograma). O mesmo foi observado para o grupo G10. No grupo G9, as frações ativas foram as frações clorofórmica (G9 Fr2) e acetato de etila (G9 Fr3). No grupo G12, apenas a fração clorofórmica (G12 Fr2) foi ativa. As frações que foram muito ativas na concentração de 100 µg/mL foram submetidas ao teste de diluição seriada para cálculo do IC₅₀ (fase 10 do fluxograma). A fração acetato de etila oriunda do grupo G8 (G8 Fr3) apresentou o maior rendimento (50,5%) e a melhor atividade com IC₅₀ = 12,6 µg/mL (Tabela 9) e foi então selecionada para dar continuidade ao estudo.

Tabela 9 - Atividade das frações oriundas do fracionamento cromatográfico dos grupos ativos G8, G9, G10 e G12 do extrato hexânico de folha de *Siparuna cujabana* sobre *L. (L.) chagasi* à 100 µg/mL e o valor de IC₅₀ em µg/mL.

Grupo G	Fração (Fr)	Massa (g)	Rendimento (%)	Atividade 100 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
G8	Ciclohexano (Fr1)	0,04	3,80	+++	20,3
	Clorofórmio (Fr2)	0,30	28,6	+++	18,2
	Acetato de etila (Fr3)	0,53	50,5	+++	12,6
	Metanol (Fr4)	0,10	9,5	+++	15,3
G9	Ciclohexano (Fr1)	0,24	23,5	0	-
	Clorofórmio (Fr2)	0,14	13,7	+++	50,3
	Acetato de etila (Fr3)	0,38	37,25	+++	52,3
	Metanol (Fr4)	0,13	12,7	0	-
G10	Ciclohexano (Fr1)	0,22	18,3	+++	23,0
	Clorofórmio (Fr2)	0,19	15,8	+++	50,5
	Acetato de etila (Fr3)	0,06	5	+++	52,3
	Metanol (Fr4)	0,49	40,8	+++	50
G12	Ciclohexano (Fr1)	0,04	1,6	0	-
	Clorofórmio (Fr2)	0,42	16,8	+++	50
	Acetato de etila (Fr3)	1,8	72	++	98,3
	Metanol (Fr4)	0,18	7,2	0	-

- não testado, 0 Inativo, ++ ativo, +++ muito ativo

Mesmo após sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel, as outras subfrações ativas não conduziram à purificação de substâncias em quantidade suficiente para a obtenção de dados espectrais ou com grau de pureza satisfatório.

Assim, a fração ativa acetato de etila oriunda do grupo G8 (G8 Fr3) foi recromatografada gerando novas 4 subfrações (SFr) (Tabela 9). A atividade das novas frações em *L. (L.) chagasi* (fase 10 do fluxograma) pode ser observada na tabela 10.

Tabela 10 - Atividade das subfrações obtidas após fracionamento da fração acetato de etila oriundo do grupo G8 obtido pelo fracionamento do extrato hexânico da folha de *S. cujabana* em *L. (L.) chagasi* à 100 µg/mL e o valor de IC₅₀ em µg/mL.

Grupo G8	Subfração (SFr)	Massa g	Rendimento %	Atividade 100 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
Frações Fr 3					
G8 – Fr3	Ciclohexano (SFr1)	0,30	57,7	+++	10,28
G8 – Fr3	Clorofórmio (SFr2)	0,05	9,6	+	-
G8 – Fr3	Acetato de etila (SFr3)	0,07	13,40	+	-
G8 – Fr3	Metanol (SFr4)	0,03	5,76	+	-

- não testado, +pouco ativo, +++ muito ativo

Em seguida, a subfração ciclohexano G8-Fr3-SFr1 (300 mg) muito ativa, com $IC_{50} = 10,28 \mu\text{g/mL}$ (fase 11 do fluxograma) em *L. (L.) chagasi*, foi recromatografada em coluna cromatográfica de purificação possibilitando o recolhimento de 815 frações de 8 mL, que por análise comparativa em CCD, foram reunidas em 13 subgrupos (SG1 a SG13) (Figura 41).

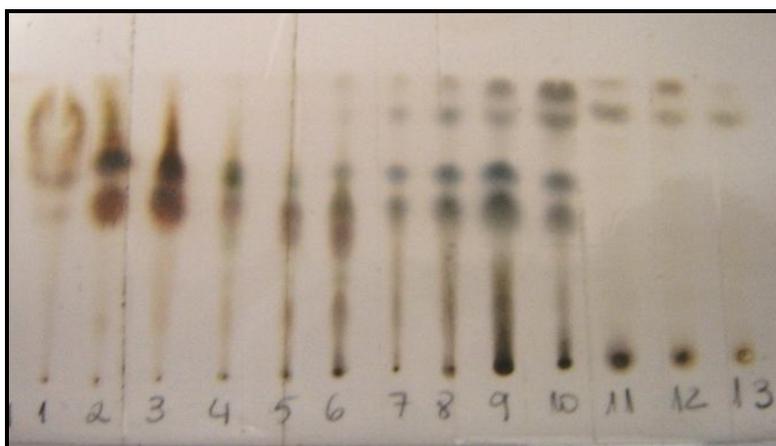


Figura 41 - Cromatografia recaptulativa dos 13 subgrupos obtidos após fracionamento da subfração ciclohexano, da fração acetato de etila, obtido do grupo G8 de *S. cujabana*. Eluente da placa: ciclohexano: acetato de etila (75:25). Revelador: vanilina sulfúrica.

A avaliação desses 13 subgrupos (SG1 a SG13) em *L. (L.) chagasi* a $100 \mu\text{g/mL}$ (fase 11 do fluxograma) demonstrou que apenas os subgrupos SG9 e SG10 não apresentaram nenhuma atividade. Os subgrupos SG11, SG12 e SG13 não foram testados, pois não havia quantidade suficiente para os experimentos (Tabela 10). Já os subgrupos SG1 a SG8 foram muito ativos na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 11).

Vale ressaltar que o processo de fracionamento possibilitou a obtenção de frações e subfrações mais ativas que o extrato bruto. O extrato bruto mostrou um $IC_{50} = 30,5 \mu\text{g/mL}$ em promastigota de *L. (L.) chagasi*. A primeira etapa do fracionamento deu origem ao grupo G8 com IC_{50} de $22,3 \mu\text{g/mL}$ e o fracionamento deste grupo gerou frações com IC_{50} entre $12,6 \mu\text{g/mL}$ e $20,3 \mu\text{g/mL}$, além da subfração G8-Fr3-SFr1 com um IC_{50} de $10,28 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 11 - Atividade dos subgrupos obtidos após fracionamento da subfração ciclohexano oriunda da fração acetato de etila, obtido do grupo G8 de *S. cujabana* em *L. (L.) chagasi* a 100 µg/mL.

Subgrupo SG	Frações	Eluente ^a	Massa G	Rendimento %	Atividade 100 µg/mL
SG1	1-32	Ch:AE (97:3/95:5)	0,04	13,3	+++
SG2	33-54	Ch:AE (95:5)	0,02	6,60	+++
SG3	55-75	Ch:AE (95:5)	0,04	13,3	+++
SG4	76-105	Ch:AE (95:5)	0,03	10,0	+++
SG5	106-120	Ch:AE (95:5)	0,02	6,60	+++
SG6	121-179	Ch:AE (95:5)	0,04	13,3	+++
SG7	180-294	Ch:AE (95:5)	0,03	10,0	+++
SG8	295-600	Ch:AE (90:10/80:20)	0,07	23,3	+++
SG9	601-720	Ch:AE (60:40/50:50)	0,010	3,30	+
SG10	721- 729	AE (100)	0,007	2,30	+
SG11	730-780	AE (100) M (100)	0,006	2,00	-
SG12	781-800	M (100)	0,003	1,00	-
SG13	801-815	M (100)	0,006	2,00	-

- não testado, +pouco ativo, +++ muito ativo

^a Eluente - Ch: ciclohexano; AE: Acetato de Etila; M: metanol.

Os subgrupos SG2 a SG8 foram reunidos e analisados em HPLC (fase 11 do fluxograma). O cromatograma obtido pela técnica de HPLC após a reunião das frações resultou no recolhimento de 6 picos majoritários com diferentes tempos de retenção variando de 2,9 min. a 7,15 min. (Figura 42).

Após o isolamento dos picos, os compostos isolados foram analisados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a identificação e confirmação da estrutura química.

Para os picos de 1 a 5 os procedimentos não conduziram ao isolamento das substâncias com grau de pureza satisfatório ou em quantidade suficiente para análise espectral.

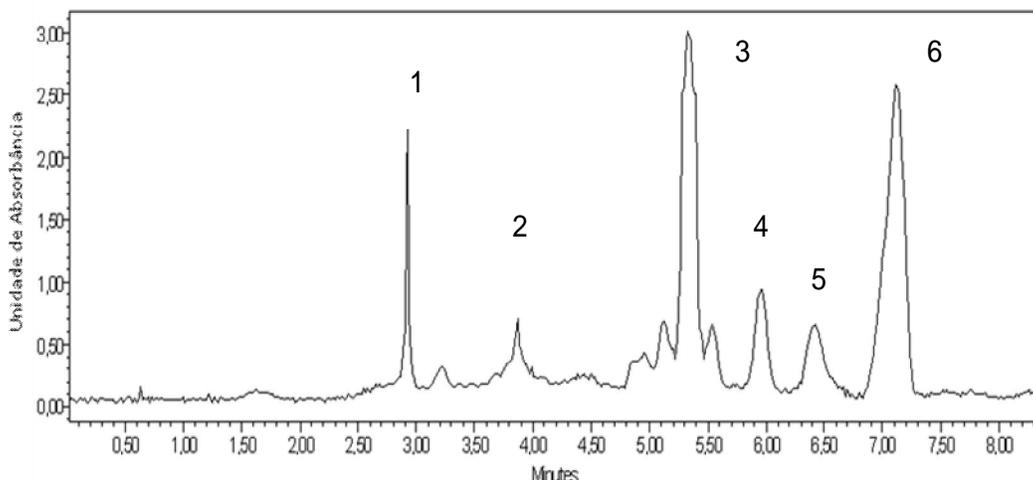


Figura 42 – Cromatograma dos subgrupos (SG2 a SG8) reunidos obtidos após fracionamento da sub-fração ciclohexano, oriundo da sub-fração acetato de etila, obtido do grupo G8 de *S. cujabana*. O cromatograma foi obtido por HPLC, em coluna X-Terra, operando em modo normal, utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (70:30) em fluxo 4,72 mL/min. (254 nm).

O composto do pico 6 foi isolado em forma de sólido cristalino de coloração branca, com odor característico. O composto apresentou ponto de fusão de 139 – 140 °C, o que está de acordo com a literatura como faixa de fusão para o sitosterol ou para fragmentos de esteróides de modo geral (Misra e Tiwari, 1973; Merck Index).

Na análise do espectro de RMN ^1H (Anexo III), verificou-se uma grande quantidade de sinais na região entre 0,67 e 1,56 ppm, padrão normalmente encontrado para substâncias esteroidais e triterpênicas. Verificou-se também a presença de um sinal na região de 5,5 ppm correspondente a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . A presença de um multiplete na região de 3,5 ppm caracteriza a presença de hidrogênio alfa ao carbono carbinólico.

A análise de espectro de RMN ^{13}C (Anexo IV) mostrou a presença de vários sinais o que descarta a hipótese de que a estrutura fosse um triterpeno e reforça a idéia de se tratar de um esteróide. Observou-se a presença de dois sinais, em 140,99 e 121,99 ppm, correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla, e um sinal em 72,05 ppm correspondente ao carbono carbinólico. A presença do sinal em 12,22 ppm reforça a hipótese de que a estrutura seja um esteróide, pois esse sinal é correspondente à metila ligada ao C29 da cadeia lateral acíclica. A comparação dos dados espectrais com a literatura (Domin-

guez e Vanegas,1972; Kongduang *et al.*, 2008) confirmou que a estrutura corresponde ao β -sitosterol (Figura 43).

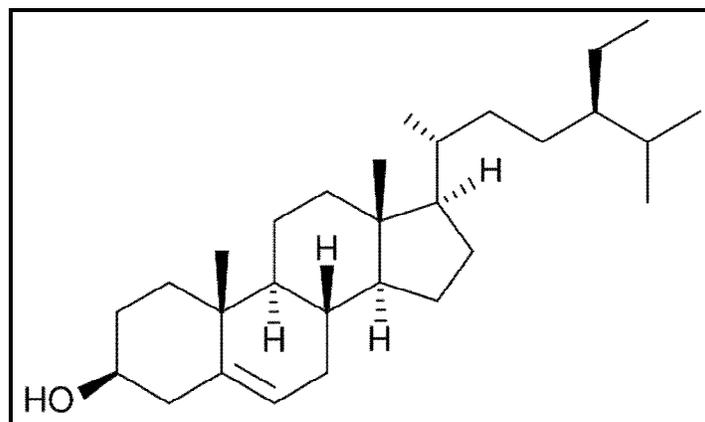


Figura 43 - Molécula do β -sitosterol. (Fonte: Merck Index).

Segundo Bresciani *et al.* (2000) bem como Carvalho e Carvalho (2001) a extração realizada com solventes apolares ou de polaridade intermediária possibilitam a extração de constituintes de baixa polaridade como os esteróis (sitosterol e estigmasterol).

O β -sitosterol é um dos vários fitoesteróis comumente encontrado em plantas superiores com estrutura química semelhante à do colesterol, mas com algumas modificações na cadeia lateral que incluem a adição de uma ligação dupla e/ou grupo metila ou etila (Awad e Fink, 2000). Os fitoesteróis são importantes componentes estruturais das membranas das plantas e servem para estabilizar bicamadas de fosfolípídeos, assim como o colesterol nas membranas de células animais (Moreau *et al.*, 2002).

Os fitoesteróis mais comuns da dieta são o sitosterol, o campesterol e o estigmasterol. Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em fitoesteróis pode oferecer uma proteção contra os tipos de câncer mais comuns do mundo ocidental. A maior parte dos estudos com β -sitosterol descritos na literatura estão relacionados ao tratamento do câncer (Awad e Fink, 2000; JU *et al.*, 2004; Ovesna *et al.*, 2004; Awad *et al.*, 2008).

Raicht *et al.* (1980) sugeriram que a dieta rica em β -sitosterol pode oferecer proteção contra o câncer de cólon induzido quimicamente. Estudos *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais humanas revelaram um efeito ini-

bitório do β -sitosterol no crescimento de células do tumor HT-29 (Awad *et al.*, 1996; Awad e Fink, 2000; Cicero *et al.*, 2004). Resultados semelhantes aos obtidos em células HT-29, porém em menor magnitude, também foram observados utilizando 16 mmol/L de β -sitosterol em uma linhagem de câncer de próstata. Na Europa, a hiperplasia prostática é tratada clinicamente com medicamentos fitoterápicos contendo β -sitosterol (Awad e Fink, 2000), mas estes produtos não foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), o órgão regulador de medicamentos nos Estados Unidos.

O efeito do β -sitosterol sobre o crescimento e a indução de apoptose de 231-MDA-MB, uma linhagem celular de câncer de mama, tem sido muito estudada (Awad *et al.*, 2008).

O mecanismo exato pelo qual o β -sitosterol oferece proteção contra o câncer não é conhecido. No entanto, várias teorias de mecanismos de ação foram propostas. Estas incluem o efeito sobre a estrutura da membrana, função do tumor e do tecido hospedeiro, vias de transdução de sinal que regulam o crescimento tumoral e apoptose, função imunológica do hospedeiro e metabolismo do colesterol (Awad e Fink, 2000).

Os fitoesteróis isolados ou em associação podem reduzir os níveis de colesterol no sangue, e às vezes, são usados no tratamento da hipercolesterolemia. O β -sitosterol inibe a absorção do colesterol no intestino (Matsuoka *et al.*, 2008).

O β -sitosterol também apresenta relatos de atividade antibacteriana e antifúngica na literatura. Os valores do halo de inibição deste composto em bactérias foram: *Escherichia coli* (10,76 mm), *Klebsiella pneumoniae* (11,49 mm), *Bacillus thuringiensis* (10,4 mm) e *Staphylococcus aureus* (9,44 mm); e em fungos: *Aspergillus niger* (9,36 mm), *A. flavus* (10,49 mm), *Rhizoctonia phaseoli* (11,3 mm) e *Penicillium chrysogenum* (11,48 mm) (Singh e Singh, 2003).

A atividade do β -sitosterol foi descrita para *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* com IC₅₀ de 52,3 e 71,1 μ g/mL, respectivamente (Calzada, 2005).

Camacho *et al.* (2003) testaram o β -sitosterol em cepas de *Plasmodium falciparum* (K1), *Trypanosoma brucei brucei* e *Leishmania donovani*, porém foi considerado inativo com IC₅₀ > 100 μ g/mL para os três protozoários. Este resultado se assemelha ao de Elfita *et al.* (2009) que testou o β -sitosterol para as

cepas de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum* e também não encontraram atividade.

O β -sitosterol já havia sido isolado na espécie *Siparuna guianensis* (Dominguez, 1961; Braz *et al.*, 1976) e em *Siparuna arianae*, na sua forma glicosilada (Kato *et al.*, 1996). Este trabalho apresenta o primeiro relato de isolamento de β -sitosterol na espécie *Siparuna cujabana*.

O uso de sitosterol como um intermediário químico foi, durante muitos anos, limitada devido à falta de um ponto de ataque químico na cadeia lateral que permita a sua remoção. A síntese total de β -sitosterol ainda não foi alcançada, mas pode-se sintetizar o β -sitosterol a partir estigmasterol, que envolve uma hidrogenação específica da cadeia lateral de estigmasterol (McCarthy *et al.*, 2005).

A outra fração estudada foi a fração ativa clorofórmica do grupo G12 (G12-Fr2). Ela foi submetida a uma coluna cromatográfica de purificação (Tabela 7) onde foram coletadas 826 frações de 8 mL, que por análise comparativa em CCD, foram reunidas em 16 subgrupos de acordo com suas semelhanças (Figura 44).

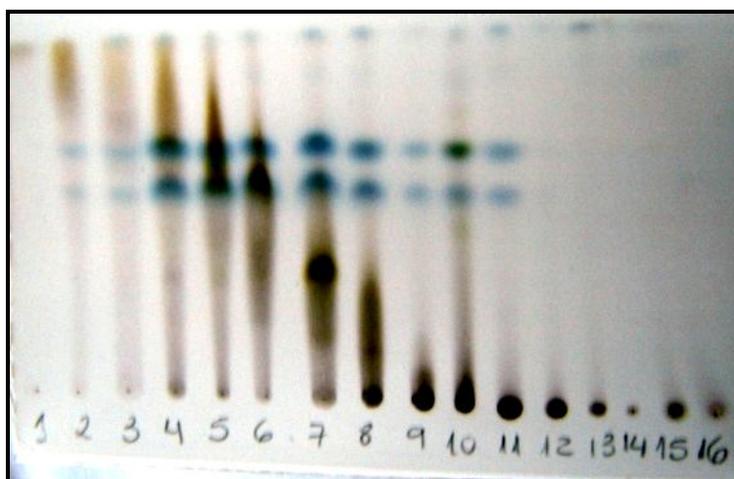


Figura 44 - Cromatografia recaptulativa dos 16 subgrupos da coluna de purificação, após fracionamento da fração clorofórmica do G12. Eluente da placa: Ciclohexano: Acetato de etila (75:25). Revelador: vanilina sulfúrica.

A atividade desses 16 subgrupos foi avaliada em formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* à 100 μ g/mL (fase 10 do fluxograma). Os subgrupos SG1 e SG3 não foram testados devido a pequena quantidade obtida. Os subgrupos

SG2, SG4 a SG9, e SG13 foram muito ativos na concentração de 100 µg/mL (Tabela 12).

Tabela 12 - Atividade dos subgrupos obtidos após fracionamento da fração clorofórmica oriundo do grupo G12 obtido pelo fracionamento de *Siparuna cujabana* em *L. (L.) chagasi* a 100 µg/mL.

Subgrupos	Frações Fr	Eluente	Massa g	Rendimento %	Atividade 100 µg/mL
SG 1	1-9	Ch:AE (95:5)	0,003	0,12	-
SG 2	10-29	Ch:AE (95:5)	0,018	0,72	+++
SG 3	30-44	Ch:AE (95:5)	0,001	0,04	-
SG 4	45-120	Ch:AE (93:7)	0,330	13,2	+++
SG 5	121-165	Ch:AE (93:7)	0,039	1,56	+++
SG 6	166-310	Ch:AE (93:7/87:13)	0,094	3,76	+++
SG 7	311-399	Ch:AE (87:13/95:15)	0,081	3,24	+++
SG 8	400-509	Ch:AE (95:15/60:40)	0,440	17,6	+++
SG 9	510-544	Ch:AE (60:40/50:50)	0,040	16	+++
SG 10	545-605	Ch:AE (50:50)	0,540	21,6	+
SG 11	606-623	Ch:AE (50:50)/AE (100)	0,018	0,72	0
SG 12	624-634	AE (100)	0,023	0,92	+
SG 13	635-670	AE (100)/M (100)	0,150	6	+++
SG 14	671-689	M (100)	0,110	4,4	+
SG 15	690-715	M (100)	0,120	4,8	0
SG 16	716-826	M (100)	0,021	0,84	0

- não testado, 0 Inativo, +pouco ativo, +++ muito ativo
Eluente - Ch: ciclohexano; AE: Acetato de Etila; M: metanol.

Os subgrupos SG4 a SG9 foram reunidos e analisados em HPLC (fase 11 do fluxograma). O procedimento permitiu o recolhimento de 4 picos majoritários de substâncias com grau de pureza insatisfatório para análise espectral (Figura 45).

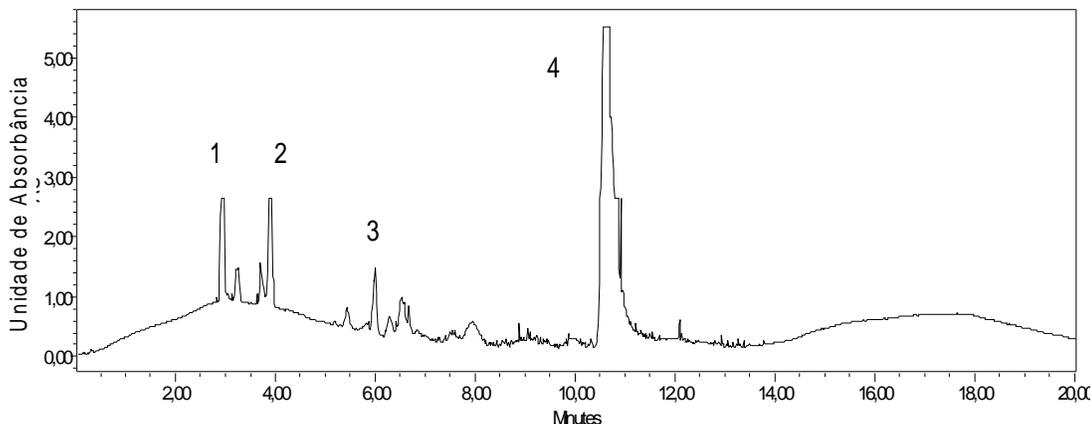


Figura 45 - Cromatograma dos subgrupos obtidos após fracionamento do sub-grupo clorofórmico oriundo do grupo G12 obtido pelo fracionamento de *Siparuna cujabana* analisados em HPLC, em coluna X-Terra, operando em modo normal, utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (80:20) em fluxo 4,72 mL/min. (254 nm).

O uso do fluxograma no estudo

O fluxograma seguido neste estudo proporcionou selecionar extratos vegetais promissores como fonte de moléculas leishmanicidas. Os pontos importantes para a tomada de decisão no processo de seleção dos extratos ativos levou em consideração a atividade em formas promastigotas do parasito, a relação de atividade para as formas intracelulares de *Leishmania*, a citotoxicidade (representada pelo índice de seletividade) e a atividade *in vivo* do extrato.

As espécies *Anemopaegma chamberlaynii* e *Protium ovatum* foram alvos deste estudo, por não apresentam relatos de atividade antiparasitária. Os extratos dessas duas espécies demonstraram atividade em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi* e para a levedura *Candida parapsilosis*. Extrato de *Protium ovatum* também foi ativo em formas epimastigotas de *T. cruzi* e para espécies de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans*.

O extrato hexânico das folhas de *Guarea guidonia* apresentou atividade em formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* e excelente resultado para a levedura *Candida krusei*. O extrato hexânico da casca do caule de *Matayba guianensis* foi ativo em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e em *Cryptococcus ssp.*, e o extrato diclorometânico da madeira do caule de *Schinus terebinthifolius*, ativo em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e para promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

Os extratos diclorometânico do rizoma de *Renealmia alpinia* e hexânico da folha de *Siparuna cujabana* se destacaram pelas atividades em diferentes formas dos parasitos e leveduras.

O extrato hexânico da folha de *Siparuna cujabana* foi fracionado para o isolamento e identificação de substância(s) ativa(s). Neste estudo, não foi possível isolar as substâncias com grau de pureza satisfatório ou em quantidade suficiente para análise espectral.

O isolamento de compostos permitirá prosseguir os estudos *in vivo*, com maior número de animais e doses do composto puro ou em associação com a miltefosina. A diminuição da dose de miltefosina na associação pode ser uma alternativa para contornar o problema de resistência do parasito e reduzir os efeitos colaterais do fármaco.

Estudos de metabólitos secundários vegetais são de particular interesse na busca de compostos ativos para o desenvolvimento de novas opções para o tratamento da leishmaniose.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, conclui-se que a partir de uma triagem *in vitro* de 120 extratos do bioma Cerrado, oriundos de 16 famílias de plantas, em formas promastigotas de *Leishmania*. (*Leishmania*) *chagasi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, um total de 14 extratos ativos foram selecionados. Posteriormente, estes extratos foram testados em formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e em leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. A citotoxicidade desses extratos foi avaliada em células de fibroblastos NIH-3T3.

O extrato hexânico das folhas de *Siparuna cujabana* apresentou IC₅₀ de 30,5 µg/mL para formas promastigotas e 28 µg/mL para amastigotas de *L. (L.) chagasi*; IC₅₀ de 63 µg/mL para promastigotas e 8,75 µg/mL para amastigotas de *L. (L.) amazonensis*; e IC₅₀ de 53 µg/mL para *T. cruzi*. Esse extrato também foi ativo em *Candida albicans* ATCC 10231, com valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 31,25 µg/mL, *Candida krusei* LMGO 174, com CIM de 62,5 µg/mL e em *Cryptococcus gattii* e espécie do Complexo *Cryptococcus neoformans*, ambos com CIM de 31,25 µg/mL.

O extrato hexânico da folha de *S. cujabana* não demonstrou ser tóxico às células de mamífero com valor de IC₅₀ de 378,55 µg/mL sobre NIH-3T3, apresentando assim índice de seletividade (SI) de 13 e 43,2 para *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* respectivamente.

O extrato hexânico da folha de *S. cujabana* em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) chagasi*, na dose de 100 mg/Kg inibiu a infecção em 52,5% e na dose de 250 mg/Kg inibiu a infecção em 71,2%.

A espécie *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) também destacou-se pela sua importante atividade. Para as formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, o extrato diclorometânico do rizoma desta planta apresentou IC₅₀ de 6,03 e 11,58 µg/mL. Para as células de mamíferos, esse extrato apresentou IC₅₀ de 235,38 µg/mL, com índice de seletividade de 39 para *L. (L.) chagasi*. Este extrato apresentou ainda atividade para as formas epimastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ = 50 µg/mL). Esse extrato foi também ativo em leveduras: *Candida krusei* LMGO 174 (CIM de 31,5 µg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* LMGO 44 (ambos com CIM de 125 µg/mL) e em *Cryptococcus gattii* (CIM de 31,5 µg/mL) e espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans*

neoformans (CIM de 7,81 µg/mL).

Considerando a atividade do extrato hexânico da folha de *S. cujabana* e diclorometânico do rizoma de *R. alpinia* em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi* e em leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* essas espécies tornam-se promissoras como fontes de compostos líderes para o tratamento da leishmaniose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIPINO, D.G. LIMA, M. SILVA, M.R. MEDA, C.I. BOLZANI, V.S. CORDEIRO, I. YOUNG, M.C.M. & MORENO, P.R.H. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities Atlantic Rain Forest-Ecological Station Juréia-Itatins. *In: Biota Neotropica*, v. 4: 1-15, 2004.

AHMED, S. Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. *In: Infect Immun.*, v. 71: 401-410, 2003.

AKISUE, G. Contribuição ao conhecimento do óleo essencial e dos alcalóides do gênero *Siparuna* Aubl. (*Siparuna apiosyce* (Martius) A.DC. *Siparuna cujabana* (Martius) A.DC. *Siparuna brasiliensis* (Sprengel) A.DC. *In: An. Farm. Quim.*, v. 17(2): 107-108, 1977.

ALGIANNIS, N. KALPOTZAKIS, K. MITAKU, S. & CHINO, L.B. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. *In: J. Agr. Food Chem.*, v. 40: 4168-4170, 2001.

ALLMENDINGER, A. SPAVIERI, J. KAISER, M. CASEY, R. HINGLEY-WILSON, S. LALVANI, A. GUIRY, M. BLUNDEN, G. & TASDEMIR, D. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three British and Irish red algae. *In: Phytother Res*: in press, 2010.

ALMEIDA, E.A. NETO, R.M.B. GUARIENTO, M.E. WANDERLEY, J.S. & SOUZA, M.L. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. *In: Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.40(3):311-315, 2007.

ALVES, W.A. & BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *In: Cad. Saúde Pública*, v. 20(1): 259-265, 2004.

AMORIM, P.K. & BATALHA, M.A. Soil characteristics of a hyperseasonal Cerrado compared to seasonal Cerrado and floodplain grassland: implications for plant community structure. *In: Braz. J. Biol.*, v. 66: 661-670, 2006.

ANTINORI, S. CASCIO, A. PARRAVICINI, C. BIANCHI, R. & CORBELLINO, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *In: Lancet Infect. Dis.*, v. 8(3): 191-199, 2008.

ARAGÃO, G.F. CUNHA PINHEIRO, M.C. NOGUEIRA, B.P. GOMES, L.T.L. & DE BARROS, V.G.S. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha - and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *In: J. Herb. Pharmacother.*, v. 7(2): 31-47, 2007.

ASHUTOSH, S.S. & GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *In: Med Microbiol*, v. 56: 143-153, 2007.

AWAD, A.B. & FINK, C.F. Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *In: J. Nutr.* v. 130: 2127-2130, 2000.

AWAD, A.B. BARTA, S.L. FINK, C.S. & BRADFORD, P.G. beta-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. *In: Mol. Nutr. Food Res.* v. 52(4): 419-26, 2008.

AWAD, A.B. CHEN, Y.C. FINK, C.S. & HENNESSEY, T. β -Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *In: Anti-cancer Res.* v. 16: 2797-2804, 1996.

AZEVEDO, A.C. COSTA, S.M. PINTO, M.C. SOUZA, J.L. CRUZ, H.C. VIDAL, J. & RANGEL, E.F. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *In: Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103(8): 760-767, 2008.

AZEVEDO, W.F.J. & SOARES, M.B. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *In: Curr. Drug Targets*, v. 10(3): 193-201, 2009.

BADARÓ, R. BENSON, D. EULÁLIO, M.C. FREIRE, M. CUNHA, S. NETTO, E.M. PEDRAL-SAMPAIO, D. MADUREIRA, C. BURNS, J.M. HOUGHTON, R.L. DAVID, J.R. & REED, S.G.; rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis. *In: J. Infect. Dis.*, v. 173: 758-761, 1996.

BAILEY, M.S. Cutaneous leishmaniasis. *In: Lockwood DN Clin. Dermatol.*, v. 25: 203-211, 2007.

BALDUÍNO, A.P.C. SOUZA, A.L. NETO, J.A.A. SILVA, A.F. & SILVA JÚNIOR, M.C. Fitossociologia e análise comparativa da composição florística do cerrado da flora de Paraopeba – MG. *In: Revis. Árvore*, v. 29: (1) 25-34, 2005.

BARROS, A.A.M. RIBAS, L.A. & ARAUJO, D.S.D. Trepadeiras da Serra da Tiri-rica *In: Rodriguésia*, v.60 (3): 681-694, 2009.

BELLIARD, A.M. LEROY, C. BANIDE, H. FARINOTTI, R. & LACOUR, B. Decrease of intestinal *P*-glycoprotein activity by 2n-propylquinoline, a new oral treatment for visceral leishmaniasis. *In: Exp Parasitol*, v. 103: 51-56, 2003.

BHATTACHARYA, S.K. SINHA, P.K. & SUNDAR, S. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *In: J. Infect. Dis.*, v. 196(4): 591-598, 2007.

BILLO, M. FOURNET, A. CABALION, P. WAIKEDRE, J. BORIES, C. LOISEAU, P. PRINA, E. DE ARIAS, A.R. YALUFF, G. FOURNEAU, C. & HOCQUEMILLER, R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 96: 569-575, 2005.

BOLETI, A.P. FREIRE, M.G.M. COELHO, M.B. SILVA, W. BALDASSO, P.A. GOMES, V.M. MARANGONI, S. NOVELLO, J.C. & MACEDO, M.L.R. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *In: J. Agr. Food Chem.*, v. 55: 2653-2658, 2007.

BOLETI, A.P. KUBO, C.E.G. & MACEDO, M.L.R. Effect of pouterin, a protein from *Pouteria torta* (Sapotaceae) seeds, on the development of *Anagasta kuhniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *In: Int J Trop Insect Sci*, v. 29(1): 24-30, 2009.

BOLETI, A.P. VENTURA, C.A. JUSTO, G.Z. SILVA, R.A. DE SOUSA, A.C.T. FERREIRA, C.V. YANO, T. & MACEDO, M.L.R. Pouterin, a novel potential cy-

totoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. *In: Toxicol.*, v. 51: 1321-1330, 2008.

BORLAUG, N.E. *Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead*. In: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. Roseville, EUA: Competitive Enterprise Institute, 2002.

BOSCARDIN, S.B. TORRECILHAS, A.C. MANARIN, R. REVELLI, S. REY, E.G. TONELLI, R.R. & SILBER, A.M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *In: J. Cell Mol. Med.*, in press, 2010.

BRAGA, F.G. BOUZADA, M.L.M. FABRI, R.L. MATOS, M. De O. MOREIRA, F.O. SCIO, E. & COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *In: J. Ethnopharmacol*, v. 111 (2): 396-402, 2007.

BRANDÃO, M.G.L. COSENZA, G.P. MOREIRA, R.A. & MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *In: Brazilian J. Pharmacognosy.*, v. 6 (3): 408-420, 2006.

BRANDÃO, MGL. ZANETTI, N.N.S. OLIVEIRA, G.R.R. & GOULART LO MONTE-MOR, R.L.M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *In: Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18: 127-134, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde (MS)/ Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. DF. 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. - Brasília: Editora do Ministério da Saúde 120 p.- (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Leishmaniose visceral grave: normas e condutas* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. - Brasília: Editora do Ministério da Saúde 60 p. - (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006b.

BRAZ, F. GABRIEL, S.J. GOMES, CM.R. GOTTLIEB. B. BICHARA, M.G.A. & MAIA, J.G.S. Oxaaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna Guianensis*. *In: Phytochemistry*, v.15:1187-1188, 1990.

_____. Oxaaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna Guianensis*. *In: Phytochemistry*, v.15, p1187-1188, 1976.

BRENDLE, J.J. OUTLAW, A. KUMAR, A. BOYKIN, D.W. PATRICK, D.A. TIDWELL, R.R. & WERBOVETZ, K.A. Antileishmanial Activities of Several Classes of Aromatic Dications. *In: Antimicrob. agents chemother.*, v. 46: 797-807, 2002.

BRENER, Z. ANDRADE, Z.A. & BARRAL-NETTO, M. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z.A. *Trypa-*

nosoma cruzi e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed: 344-378, 2000.

BRENZAN, M.A. NAKAMURA, C.V. DIAS FILHO, B.P. UEDA-NAKAMURA, T. YOUNG, M.C.M. & CORTEZ, D.A.G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. In: *Parasitol. Res.*, v. 101: 715-722, 2007.

BRESCIANI, L.F.V. CECHINEL-FILHO, V. & YUNES, R.A. Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. In: *Nat. Prod. Lett.*, v. 14: 247-254, 2000.

BRICEÑO-LEÓN, R. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. In: *Cad. Saúde Pública*, v. 25(1): 71-82, 2009.

CALABRESE, K.C. & GONÇALVES DA COSTA, S.C. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG antigen specific vaccine. In: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87: 49-56, 1992.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). In: *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33(2): 179-189, 2000.

CALZADA, F. Additional Antiprotozoal Constituents from *Cuphea pinetorum*, a Plant Used in Mayan Traditional Medicine to Treat Diarrhoea. In: *Phytother. Res.* v. 19: 725-727, 2005.

CAMACHO, M.R. PHILLIPSON, S.L. CROFT, P.N. MARSHALL, S.J. & GHANZANFAR, S.A. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. In: *J. Ethnopharmacol.*, v. 89: 185-191, 2003.

CAMARGO, L.M.A. & BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, Feridas Bravas e Kalazar. *Rev.Cienc. Cult.*, 34-37, 2003.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. & SANTUCCI, S.G. *Leishmaniose Visceral Americana*. *Superintendência de Controle de Endemias 2000-2001- SUCEN*. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 2005.

CAROD-ARTAL, F.J. Globalization, stroke and Chagas disease on the hundredth anniversary of its discovery. In: *Neurologia*, v. 24(6): 431-432, 2009.

CARRANZA-TAMAYO, C.O. DE ASSIS, T.S. NERI, A.T. CUPOLILLO, E. RABELLO, A. & ROMERO, G.A. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. In: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 103(7): 743-748, 2009.

CARVALHO, F.A. RODRIGUES, V.H.P. KILCA, R.V. SIQUEIRA, A.S. ARAÚJO, G.M. & SCHIAVINI, I. Composição Florística, riqueza e Diversidade de um Cerrado *Sensu Stricto* no Sudeste do Estado de Goiás Biosci. In: *J. Uberlândia*, v. 24(4): 64-72, 2008.

CARVALHO, G.J.A. CARVALHO, M.G. FERREIRA, D.T. FARIA, T.J. & BRAZ-FILHO, R. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. In: *Quim. Nova*, v. 24: 24-26, 2001.

CASTRO, E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. In: *Transfus. Med.*, v. 19(1): 16-23, 2009.

CATORZE, M.G.B. Leishmaniose e SIDA. In: *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.*, v. 33(6): 237-250, 2005.

CECIL, R.L. *Cecil tratado de medicina interna*. Rio de Janeiro: Elsevier, 22. ed, 2005.

CÉLINE, V. ADRIANA, P. ERIC, D. JOAQUINA, A.B. YANNICK, E. AUGUSTO, L.F. ROSARIO, R. DIONICIA, G. MICHEL, S. DENIS, C. & GENEVIÈVE, B. Medicinal plants from the Yanessa (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. In: *J. of Ethnopharmacol.*, v. 123(3): 413-422, 2009.

CERQUEIRA, J.L. SHERLOCK, I. GUSMÃO, A. JUNIOR A, de A. B. & NAKATANI, M. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. In: *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, v. 36(6): 695-701, 2003.

CHAPPUIS, F. SUNDAR, S. HAILU, A. GHALIB, H. RIJAL, S. PEELING, R.W. ALVAR, J. & BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? In: *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5: 873-882, 2007.

CHIN, Y.W. BALUNAS, M.J. CHAI, H.B. & KINGHORN, A.D. Drug Discovery from Natural Sources. In: *AAPS Journal*, v. 8: 239-253, 2006.

CIANCIARUSO, M.V. & BATALHA, M.A. Short-term community dynamics in seasonal and hyperseasonal Cerrado. In: *Braz. J. Biol.*, v. 69(2): 231-240, 2009.

CICERO, A.F. MINARDI, M. MIREMBE, S. PEDRO, E. & GADDI, A. Effects of a new low dose soy protein/beta-sitosterol association on plasma lipid levels and oxidation. In: *Eur. J. Nutr.*, v.43(5): 319-322, 2004.

COELHO, A.A.M. DE PAULA, J.E. & ESPINDOLA, L.S. Insecticidal activity of Cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. In: *Neotropical Entomology*, v. 35(1): 133-138, 2006.

CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas Vol. IV. In: *Inst. Brasileiro de Desenv. Florestal*, v. 41: 646 - 656, 1978.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Vol. I. Imprensa Nacional: 660-662, 1926.

CORREIA, M.C.R. PINHEIRO & M.C.B. DE LIMA, H.A. Produção de frutos e germinação das sementes de *Anemopaegma chamberlaynii* Bur. & K. Schum. (Bignoniaceae) - Um registro de poliembrionia. In: *Revista Sientibus Série Ciências Biológicas*, v. 5: 68-71, 2005.

COSTA, A.F. *Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de Anemopaegma arvense (Vell.) Steff.* Mestrado. Universidade De Ribeirão Preto - Biotecnologia, 77, 2007.

COSTA, C.H.N. & VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *In: Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34: 223-228, 2001.

COURA, J.R. & CASTRO, S.L. A critical review on Chagas Disease Chemotherapy. *In: Mem. Int. Oswaldo Cruz*, v. 97: 3-24, 2002.

CRISTOVAM, P.C. DA GLÓRIA, M.A. MELO, G.B. & GOMES, J.A.P. Importance of 3T3 feeder layer to establish epithelial cultures from cell suspension obtained from corneo-scleral rims. *In: Arq. Bras. Oftalmol.*, v. 71(5): 689-94, 2008.

CROFT, S.L. SEIFERT, K. & YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *In: Ind. J. Med. Res.*, v. 123: 399-410, 2006.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification.* New York: Columbia University Press, 1981.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *In: Exp. Mol. Pathol.*, v. 72: 131-141, 2002.

DE LIMA, M.R. DE SOUZA, L. J. DOS SANTOS, A.F. DE ANDRADE, M.C. SANT'ANA, A.E. GENET, J.P. MARQUEZ, B. NEUVILLE, L. & MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 105(1-2): 137-147, 2006.

DE MESQUITA, M.L. DE PAULA, J.E. PESSOA, C. DE MORAES, M.O. COSTA-LOTUFO, L.V. GROUGNET, R. MICHEL, S. TILLEQUIN, F. & ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 123(3): 439-445, 2009.

DE MESQUITA, M.L. DESRIVOT, J. BORIES, C. FOURNET, A. DE PAULA, J.E. GRELLIER, P. & ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *In: Mem. Int. Oswaldo Cruz*, v. 100 (7): 783-787, 2005a.

DE MESQUITA, M.L. GRELLIER, P. BLOND, A. BROUARD, J. DE PAULA, J.E. ESPINDOLA, L.S. & MAMBU, L. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. *In: Bioorgan. Med. Chem.*, v. 13: 4499-4506, 2005b.

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. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 110: 165-170, 2007.

DEOK-JONG YOO, S. WORODRIA, W. DAVIS, J.L. CATTAMANCHI, A. DEN BOON, S. KYEYUNE, R. KISEMBO, H. & HUANG, L. The Prevalence and Clinical Course of HIV-Associated Pulmonary Cryptococcosis in Uganda. *In: J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, in press, 2010.

- DESAI, S.P. KOJIMA, K. VACANTI, C.A. & KODAMA, S. Lidocaine inhibits NIH-3T3 cell multiplication by increasing the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21). *In: Anesth. Analg.*, v. 107(5): 1592-1597, 2008.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *In: Comp. Immunol. Microb.*, v. 27(5): 305-318, 2004.
- DIAS DA SILVA, R.A. *Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Ed. Nacional, 1926.
- DIAS, J.C.P. Globalization, inequity and Chagas disease. *In: Cad. Saúde Pública*, v. 23(1): 13-22, 2007.
- DOMINGUEZ, X.A. & VANEGAS, M.T. Mexican medicinal plants. XX. Terpenoids of the aerial parts of *Asclepias latifolia*. *In: Phytochemistry*, v. 11, (2): 848, 1972.
- DOMINGUEZ, X.A. Analisis fitoquímica. *In: Ciência México*, v. 21: 125-135, 1961.
- DUBE, A. SINGH, N. SUNDAR, & S. SINGH, N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persists in in vitro and in vivo experimental models. *In: Parasitol. Res.*, v. 96: 216-223, 2005.
- DUJARDIN, J.C. *Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? Trends Parasitol.*, v. 21: 316-321, 2005.
- DUTTA, A. BANDYOPADHYAY, S. MANDAL, C. & CHATTER J. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *In: Parasitol. Intern.*, v. 54: 119-122, 2005.
- EITEN, G. Vegetação do Cerrado. *In: PINTO, M.N. (org.). Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1994.
- ELFITA, E. MUHARNI, M. LATIEF, M. DARWATI, D. WIDIYANTORO, A. SUPRIYATNA, S. BAHTI, H.H. DACHRIYANUS, D. COS, P. MAES, L. FOUBERT, K. APERS, S. & PIETERS, L. Antiplasmodial and other constituents from four Indonesian *Garcinia* spp. *In: Phytochemistry*, v. 70: 907-912, 2009.
- EL-SEEDI, H. GHIA, F. & TORSELL, K.B.G. Cadinane sesquiterpenes from *Siparuna macrotrepala*. *In: Phytochemistry*, v. 35: 1495-1497, 1994.
- EMBRAPA CENARGEM, 2007.
- ESPINDOLA, L.S. Cerrado: fonte de descoberta de novos medicamentos. *In: Brasília Med.*, v. 44: 193-198, 2007.
- ESPINDOLA, L.S. VASCONCELOS, J.R. MESQUITA, M.L. MARQUIE, P. DE PAULA, J.E. MAMBU, L. & SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new di-terpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *In: Planta Medica*, v. 70: 1093-1095, 2004.

FENG, W.L. YANG, J. XI, Z.Q. WANG, Y.Q. ZHANG, R.M. JI, Y. WU, Y. & JIA, X.Q. Epidemiologic study on patients with invasive fungal infections, *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, v. 30(10): 1043-1046, 2009

FICHOUX, Y. ROUSSEAU, D. FERRUA, B. RUETTE, S. LELIÉVRE, A. GROUSSON, D. & KUBAR, J. Short- and Long-Term Efficacy of Hexadecylphosphocholine against Established *Leishmania infantum* Infection in BALB/c Mice. In: *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42: 654-658, 1998.

FISCHER, D.C.H. GUALDA, N.C. BACHIEGA, D. CARVALHO, C.S. LUPO, F.N. BONOTTO, S.V. ALVES, M. DE O. YOGI, A. DI SANTI, S.M. AVILAC, P.E. KIRCHGATTER, K. & MORENO, P.R.H. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. In: *Acta Tropica*, v. 92: 261-266, 2004.

FONSECA, T.L. GROLL, A.V. LEITÃO, G.G. SCAINI, C.J. RAMOS, D.F. & DA SILVA, P.E.A. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoei*. In: *Vittalle*, v. 20(1): 65-71, 2008.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A. MUÑOZ, V. HOCQUEMILLER, R. CAVÉ A., BRUNETON, J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 37:859–863. 1993.

FRANCO, A.C. *Biodiversidade de forma e função: implicações ecofisiológicas das estratégias de utilização de água e luz em plantas lenhosas do Cerrado*. In: *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação 179-196*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: John Wiley & Sons, 3ª edição, 1994.

GACHET, M.S. LECARO, J.S. KAISER, M. BRUN, R. NAVARRETE, H. MUÑOZ, R.A. BAUER, R. & SCHÜHLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. In: *J. Ethnopharmacol.*, v. 128(1): 184-97, 2010.

GAMA, M.E.A. BARBOSA, J. de S. & PIRES, B. Avaliação do Nível de Conhecimento que Populações Residentes em Áreas Endêmicas têm sobre Leishmaniose Visceral, Estado do Maranhão, Brasil. In: *Cadernos de Saúde Pública*, v. 14(2): 381-390, 1998.

GERLIER, D. & THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. In: *J. Immunol. Methods*, v. 94: 57-63, 1986.

GIBBS, R.D. Chemotaxonomy of flowering plants Cambridge. In: *Mc Gill-Queen's*, v.3: 1413-1443, 1974.

GLASSER, P.R. *Avaliação do Emprego de Coleiras Impregnadas com Deltametrina em Cães, Como Medida Complementar de Controle da Leishmaniose Visceral Americana na Cidade de Araçatuba-SP - Brasil*. Tese apresentada a São Paulo. Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Pro-

grama de Pós-Graduação em Ciências para obtenção do grau de Mestre. 83p. São Paulo. 2005.

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. *In: Ver. Bras. Epidemiologia*, v. 7(3): 338-349, 2004.

GUERRA, M.J.M. BARREIRO, M.L. RODRÍGUEZ, Z.M. & RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). *In: Ver. Cubana Plant. Med. (Habana)*, v. 5(1): 23-25, 2000.

GUPTA, M.B. NATH, R. SRIVASTAVA, N. SHANKER, K. & KISHOR, K. Anti-inflammatory and Antipyretic Activities of *B-sitosterol*. *In: Planta Med.*, v. 339: 157-163, 1980.

GUPTA, S. RAYCHAUDHURI, B. BANERJEE, S. BANASRI, B. MUKHOPADHAYA, S. & DATTA, S.C. Momordicin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. *In: Parasitol. Int.*, in Print, 2010.

HAILU, A. MUSA, A.M. ROYCE, C. & WASUNNA, M. Visceral Leishmaniasis. *In: New Health Tools Are Needed*, v. 2(7): 211:0590-0594, 2005.

HARIDASAN, M. *Biogeografia do Bioma Cerrado: vegetação e solos. Solos da Chapada dos Veadeiros*. Brasília: Editora Universidade de Brasília/ FINATEC, 2007.

HEFFERON, K. Plant Biotechnology Patents: Applications in Agriculture and Medicine. *In: Recent Pat Biotechnol* in press, 2010.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der pflanzen. *In: Basel: Birkhauser Verlag*, v. 9: 66-72, 1990.

HERZOG-SOARES, J.A. ISAC, E. CASTRO, A. M. BEZERRA, J.C.B. Bioatividade *Stryphnodendro adstringens*, *S. Polyphyllum*, *Caryocar brasiliense*, plantas do cerrado brasileiro, sobre *Trypanosoma cruzi* "in vivo". *In: Biosci. J.*, v. 22(3): 113-118, 2006.

HOLANDA PINTO, S.A. PINTO, L.M. CUNHA, G.M. CHAVES, M.H. SANTOS, F.A. & RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *In: Inflammopharmacology*, v. 16(1): 48-52, 2008.

JENETT-SIEMS, K. KRAFT, C. SIEMS, K. JAKUPOVIC, J. SOLIS, P.N. GUPTA, M.P. & BIENZLE, U. Sipaucins A-C, sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. *In: Phytochemistry*, v. 63(4): 377-381, 2003.

JENETT-SIEMS, K. SIEMS, K. JAKUPOVIC, J. SOLIS, P.N. GUPTA, M.P. MOCKENHAUPT, F.P. BIENZLE, U. & EICH, E. Sipandinolide: a butenolide including a novel type of carbon skeleton from *Siparuna andina*. *In: Planta Med.*, v. 66(4): 384-385, 2000.

JOHANN, S. PIZZOLATTI, M.G. DONNICI, C.L. & RESENDE, M.A. Atividade Antifúngica de plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira contra fungos de relevância clínica. *In: Braz. J. Microbiol.*, v. 38 (4): 632-637, 2007.

JU, H. CLAUSEN, L.M. ALDRED, K.F. ALMADA, A.L. & HELFERICH, W.B. β -Sitosterol, β -sitosterol glucoside and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *in vitro* and in ovariectomized athymic mice. *In: J. Nutr.*, v. 134: 1145-1151, 2004.

KATO, N. CLAROS, B.M.G. BRITO, A.P.P. VALVERDE, S.S.S. MACHADO, B.T.B. & LEITÃO, G.G. Constituintes químicos de dois gêneros de monimiaceae. *In: Simpósio De Plantas Medicinais do Brasil 14*, Florianópolis, Resumos, 195 Q- 099, 1996.

KAYSER, O. KIDERLEN, A.F. & CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. *In: Parasitol. Res.*, v. 90: S55-S62, 2003.

KESSLER, A.T. KHARRAT, T. & KOURTIS, A.P. Cryptococcus neoformans as a cause of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *In: J. Infect. Chemother.*, in press, 2010.

KLINK, C.A. & MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *In: Megadiversidade*, v. 1(1), 2005.

KOEHN, F.E. & CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *In: Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 4: 206-220, 2005.

KOLODZIEJ, H. & KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitized RAW 264.7 cells. *In: Phytochemistry* in press, 2005.

KONGDUANG, J. WUNGSINTAWEEKUL, J. & DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *In: Tetrahedron Letters*, v. 49: 4067-4072, 2008.

KOSALEC, I. CVEK, J. & TOMIĆ, S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *In: Arh. Hig. Rada Toksikol.*, v. 60(4): 485-501, 2009.

KROPF, S.P. & SÁ, M.R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *In: Hist. Cienc. Saúde Mangui-nhos*, v. 16(1): 13-34, 2009.

KROPF, S.P. *Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil*. Rio de Janeiro: Tempo, v. 19: 107-124, 2005.

KURIA, J.K. WAHOME, R.G. JOBALAMIN, M. & KARIUKI, S.M. Profile of bacteria and fungi on money coins. *In: East Afr. Med. J.*, v. 86(4): 151-5, 2009.

LAGO, J.H.G. BROCHINI, C.B. & ROQUE, N.F. Terpenoids from *Guarea guidonia*. *In: Phytochemistry*, v. 60: 333-338, 2002.

LAKSHMI, V. PANDEY, K. KAPIL, A. SINGH, N. SAMANT, M. & DUBE, A. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. In: *Phytochemistry*, v. 14: 36-42, 2007.

LEITÃO, G.G. SIMAS, N.K. SOARES, S.S. DE BRITO, A.P. CLAROS, B.M. BRITO, T.B. & DELLE MONACHE, F. Review: Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on Siparuna and Mollinedia. In: *J. Ethnopharmacol.*, v. 65(2): 87-102, 1999.

LEITÃO, G.G. SOARES, S.S. BRITO, T.D. & DELLE MONACHE, F. Kaempferol glycosides from *Siparuna apiosyce*. In: *Phytochemistry*, v. 55(6): 679-682, 2000.

LENTA, B.N. VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.R. SOHD, F. TANTANGMO, F. NGOUELA, S. KAISER, M. TSAMO, E. ANTON, R. & WENIGER, B. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. In: *J. Ethnopharmacol.*, v. 111: 8-12, 2007.

LINDOSO, G.S. & FELFILI, J.M. Características florísticas e estruturais de Cerrado *sensu stricto* em Neossolo Quartzarênico. In: *Ver. Bras. Biociências*, v. 5(2): 102-104, 2007.

LIRUSSI, D. LI, J. PRIETO, J.M. GENNARI, M. BUSCHIAZZO, H. RIOS, & J.L. ZAIDENBERG, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. In: *Fitoterapia*, v. 75: 718-723, 2004.

LOPEZ, J.A. LAURITO, J.G. LIN, F. DUAH, F.K. SHARAF, M. ALY, Y. WONG, L.K. & SHIFF, J.P.L. Alkaloids of *Siparuna griseo-flavescens*. In: *Planta Med.*, v. 59(1): 100-103, 1993.

LOPEZ, J.A. LAURITO, J.G. LIN, F. DUAH, F.K. SHARAF, M. ALY, Y. WONG, L.K. & SHIFF, J.P.L. Alkaloids of *Siparuna tonduziana*. In: *Planta Med.*, v. 56(5): 492, 1990.

LOSS, R. SANDRIN, R. FRANÇA, B.H. DE AZEVEDO-ALANIS, L.R. GRÉGIO, A.M. MACHADO, M.A. & LIMA, A.A. Cytological analysis of the epithelial cells in patients with oral candidiasis. In: *Mycoses*, in press, 2010.

MACÊDO, D.P.C. SILVA, V.K.A. FARIAS, A.M.A. MELO, L.R.B. WILHEIM, A.B. & NEVES, R.P. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. In: *Braz. J. Microbiol.*, v. 39: 1-7, 2008.

MACHADO, R.B. *A fragmentação do Cerrado e efeitos sobre a avifauna na região de Brasília-DF*. Tese de doutorado. Curso de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2000.

MACHADO, R.B. RAMOS, M.B. NETO, P.G.P. PEREIRA, E.F. CALDAS, D.A. GONÇALVES, N.S. SANTOS, K. & TABOR, M.S. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, 2004.

MAES, L. BERGHE, D. V. GERMONPREZ, N. QUIRIJNEN, L. COS, P. DE KIMPE, N. & PUYVELDE, L.V. In Vitro and In Vivo Activities of a Triterpenoid Saponin Extract (PX-6518) from the Plant *Maesa balansae* against Visceral

Leishmania Species. In: *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48(1): 130-136, 2004.

MALINI, T. & VANITHAKUMARI, G. Effect of beta-sitosterol on uterine biochemistry: a comparative study with estradiol and progesterone. In: *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v. 31: 659-668, 1993.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural product and evaluating. In: WASNER, H. & WALFF, L(ed). *Natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin: Spring Verlag: 23-56, 1977.

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

MALTEZOU, H.C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: 1-8, 2010.

MANJARREZ, A. & MENDOZA, V. Volatile Oil of the fruits of *Siparuna nicaraguensis*. In: *Perfumery and Essential Oil Record*, v. 58(1): 23-24, 1967.

MARCHESE, R. *Atividade in vitro dos constituintes do extrato hexânico das folhas e pseudocaulis de Renealmia alpinia (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) sobre Leishmania ssp.* Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2009.

MARQUES, C.A. LEITÃO, G.G. BIZZO, H.R. KRANZ, W.M. PEIXOTO, A.L. & VIEIRA, R.C. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). In: *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.*, v. 18(3), 2008.

MARQUES, N. CABRAL, S. SÁ, R. COELHO, F. OLIVEIRA, J. SARAIVA DA CUNHA, J.G. & MELIÇOSILVESTRE, A. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana. In: *Acta Med Port*, v. 20: 291-298, 2007.

MARTÍNEZ, M.J. ALONSO GONZÁLEZ, N. & BADELL, J.B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). *Rev Cubana Plant Med (Habana)*, v. 1(3): 37-9, 1996.

MATSUOKA, K. NAKAZAWA, T. NAKAMURA, A. HONDA, C. ENDO, K. & TSUKADA, M. Study of Thermodynamic Parameters for Solubilization of Plant Sterol and Stanol in Bile Salt Micelles. In: *Chem. Phys. Lipids*, v. 154: 87-93, 2008.

MCCABE, R.E. REMINGTON, J.S. & ARAUJO, F.G. In vitro and in vivo activities of formycin B against *Trypanosoma cruzi*. In: *Antimicrob Agents Ch*, v. 27: 491-494, 1994.

MCCARTHY, F.O. CHOPRA, J. FORD, A. HOGAN, S.A. KERRY, J.P. O'BRIEN, N.M. RYAN, E. & MAGUIRE, A.R. Synthesis, isolation and characterisation of b-sitosterol and b-sitosterol oxide derivatives. In: *Org.Biomol. Chem*, v. 3: 3059-3065, 2005.

MEDEIROS, I.M. NASCIMENTO, E.L.T. & HINRICHSEN, S.L. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: *DIP - Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 398-409, 2005.

MELBY, P.C. YANG, J. ZHAO, W. PEREZ, L.E. & CHENG, J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA Vaccine Is Highly Immunogenic but Not Protective against Experimental Visceral Leishmaniasis. In: *Infection and immunity*, v. 69(8): 4719-4725, 2001.

MELLO, D. A. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rengger, 1830) (Cricetidae-Rodentia) a quatro espécies de parasitas. In: *Rev. Soc. bras. Med. trop*, v. 13: 101-5, 1980.

MELLO, M.P. PRADO, B.R. SILVA, G.B.S. SHIMABUKURO, Y.E. & EDEMIR, Y. Comportamento espectral de fitofisionomias do Cerrado e desenvolvimento de índices utilizando bandas sintéticas derivadas de Modelos Lineares de Mistura Espectral aplicados na discriminação de fitofisionomias. *Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. Natal: 25-30, INPE: 2839-2846, 2009.

MELO E SILVA, F. DE PAULA, J.E. & ESPINDOLA, L.S. Evaluation of the anti-fungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. In: *Mycoses*, v. 52(6): 511-517, 2009.

MENDES, B.G. MACHADO, M.J. & FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. In: *Rev Bras Farmacogn*, v. 16: 568-575, 2006.

MERCK index. 13 ed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., 1741, 2001.

MISRA, N.A. & TWARI, H.P. Mass spectral studies of phytosterolins and a ketone from *Trianthema pentandra*. In: *Phytochemistry*, v. 12: 393-395, 1973.

MOEN, M.D. LYSENG-WILLIAMSON, K.A. & SCOTT, L.J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. In: *Drugs*, v. 69(3): 361-92, 2009.

MOREAU, R.A. WHITAKER, B.D. & HICKS, K.B. Phytosterols, Phytostanols, and Their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitative Analysis, and Health-Promoting Uses. In: *Prog. Lipid Res*, v. 41: 457-500, 2002.

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

MURRAY, H.W. BERMAN, J.D. DAVIES, C.R. & SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. In: *Lancet*, v. 366: 1561-1577, 2005.

MYERS, N. MITTERMEIER, R.A. MITTERMEIER, C.G. DA FONSECA, G.A.B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. In: *Nature*, v. 403: 853-858, 2000.

NAKAYAMA, H. DESRIVOT, J. BORIES, C. FRANCK, X. FIGADE`RE, B. HOCQUEMILLER, R. FOURNET, A. LOISEAU, P.M. & NAKAYAMA, H. In vitro

and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. In: *Biomed Pharmacother*, v. 61(2-3): 186-188, 2007.

NAKAYAMA, H. LOISEAU, P.M. BORIES, C. DE ORTIZ, S.T. SCHININI, A. SERNA, E. DE ARIAS, A.R. FAKHFAKH, M.A. FRANCK, X. FIGADERE, B. HOCQUEMILLER, R. & FOURNET, A. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. In: *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 49: 4950-4956, 2005.

NEITZKE, H.C. SCODRO, R.B. DE L. DE CASTRO, K.R.R. SVERSUTTI, A.C.D. SILVEIRA, T.G.V. & TEODORO, U. Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná. In: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41(1): 17-22, 2008.

NEOFYTOS, D. FISHMAN, J.A. HORN, D. ANAISSIE, E. CHANG, C.H. OLYAEI, A. PFALLER, M. STEINBACH, W.J. WEBSTER, K.M. & MARR, K.A. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. In: *Transpl Infect Dis*, in press, 2010.

NETO, A.G. DA SILVA FILHO, A.A. COSTA, J.M.L.C. VINHOLIS, A.H.C. SOUZA, G.H.B. CUNHA, W.R. SILVA, M.L.A. ALBUQUERQUE, S. & BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and antileishmanial in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. In: *Phyto-medicine*, v. 11: 662-665, 2004.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. In: *J Nat Prod*, v. 70: 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J. CRAGG, G.M. & SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. In: *J Nat Prod*, v. 66(7): 1022-1037, 2003.

NIBRET, E. ASHOUR, M.L. RUBANZA, C.D. & WINK, M. Screening of Some Tanzanian Medicinal Plants for their Trypanocidal and Cytotoxic Activities. In: *Phytother. Res. [Epub ahead of print]*, 2009.

NUCCI, M. & MARR, K.A. Emerging fungal diseases. In: *Clinical Infectious Diseases*, v. 41: 521-526, 2005.

NUNES, C.M. PIRES, M.M. DA SILVA, K.M. ASSIS, F.D. FILHO, J.G. & PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. In: *Vet Parasito, [Epub ahead of print]*, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, A.T. & RATTER, J.A. A study of the origin of central Brazilian forests by analysis of plant species distribution patterns. In: *Edinburg Journal of Botanic*, v. 52(2): 141-194, 1995.

OMS- *Organização mundial de Saúde (OMS)* - Control of leishmaniasis SIXTIETH WORLD HEALTH ASSEMBLY-Provisional agenda, 2006.

OMS- *Organização mundial de Saúde (OMS)* - Report of the Fifth Consultative Meeting On *Leishmania/HIV* Coinfection-Addis Ababa, Ethiopia: 20-22, 2007.

OMS- *Organização mundial de Saúde (OMS)*, "Leishmaniasis: burden of disease," 2009. Disp. in: <http://www.OMS.int/leishmaniasis/burden/en>.

Organización Panamericana de la Salud Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas Río de Janeiro, PANAFTOSA, 152p. I. Informe Final de la Reunión de Expertos OPAS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, 2006.

ORHAN, I. ASLAN, M. SENER, B. KAISEN, M. & TASDEMIR, D. In vitro anti-protozoal activity of the lipophilic extracts of different parts of Turkish *Pistacia vera* L. *In: Phytomedicine*, v. 13: 735- 739, 2006.

OSORIO, D.E.J. MONTOYA, P.G.L. & ARANGO, A.G.J. Productos Naturales Alcaloidales com Actividad Antiprotozoaria. *In: Rev de La Facultad de Química Farmaceutica*, v. 13(1): 61-84, 2006.

OUELLETTE, M. DRUMMELSMITH, J. & PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *In: Drug Resistance Updates*, v. 7: 257-266, 2004.

OVESNA, Z. VACHALKOVA, A. & HORVATHOVA, K. Taraxasterol and β -sitosterol: New naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *In: Neoplasma*, v. 51 (6): 407-414, 2004.

PAL, C. RAHA, M. BASU, A. ROY, K.C. GUPTA, A. GHOSH, M. SAHU, N.P. BANERJEE, S. MANDAL, N.B. & BANDYOPADHYAY, S. Combination Therapy with Indolyquinoline Derivative and Sodium Antimony Gluconate Cures Established Visceral Leishmaniasis in Hamsters. *In: Antimicrob Agents Chemother*, v. 46: 259-261, 2002.

PALUMBO, E. Oral Miltefosine Treatment in Children With visceral Leishmaniasis: a Brief Review. *In: The Brazilian J of Infec Diseases*, v. 12(1): 2-4, 2008.

PANDEY, B.D.K. PANDEY, O.K. YANAGI, T. & HIRAYAMA, K. Relapse of Visceral Leishmaniasis after Miltefosine Treatment in a Nepalese Patient The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. *In: Am J Trop Med Hyg*, v. 80(4): 580-582, 2009.

PARIS, C. LOISEAU, P.M. BORIES, C. & BRÉARD, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *In: Antimicrob. Agents Chemother*. v. 48(3): 852-859, 2004.

PASSERO, L.F.D. CASTRO, A.A. TOMOKANE, T.Y. KATO, M.J. PAULINETTI, T.F. CORBETT, C.E.P. & LAURENTI, M.D. Anti-Leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. *In: Parasitol. Res.*, v. 101: 677-680, 2007.

PECKOLT, T. & PECKOLT, G. *Historia das Plantas Medicinaiis e Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro, Lemmert, 1888.

PEKOLT, T.H. Composition of essential oil from the leaves of *Siparuna guianensis* (Monimiaceae). *In: Chem. Ind., London*, v. 14: 514-515, 1984.

- PENNA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. Rio de Janeiro: Livraria Kosmo Editora. 348, 1941.
- PFALLER, M.A. & DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *In: Crit. Rev. Microbiol.*, v. 36(1): 1-53, 2010.
- PINTO, A.Y. FERREIRA, A.G.J.R. VALENTE, V.C. HARADA, G.S. & VALENTE, S.A. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *In: Rev. Panam Salud Publica*, v. 25(1): 77-83, 2009.
- PINTO, I.S. FILHO, J.D. SANTOS, C.B. FALQUETO, A. & LEITE, Y.L. Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia*, subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *In: J. Med. Entomol.*, v. 47(1): 16-21, 2010.
- PINTO, J.R.R. OLIVEIRA-FILHO, A.T. & HAY, J.D.V. Influence of soil and topography on the composition of tree community in a Central Brazilian forest. *In: J. of Botany*, v. 62: 69-90, 2006.
- PISCOPO, T.V. & MALLIA, A.C. Leishmaniasis Postgraduate. *In: Med. J.*, v. 83: 649-657, 2007.
- PIVELLO, V.R. & COUTINHO, L.M. A qualitative successional model to assist in the management of Brazilian Cerrados. *In: Forest Ecology and Management*, v. 87(1-3): 127-138, 1996.
- POURAHMAD, M.M.D. HOOSHMAND, F.M.D. & RAHIMINEJAD, M.M.D. From the Faculty of Medicine, Jahrom, Iran Cutaneous leishmaniasis associated with visceral leishmaniasis in a case of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *In: Int. J. of Dermatol.*, v. 48(1): 59 - 61, 2008.
- POZIO, E. Highly Active Antiretroviral Therapy and opportunistic protozoan infections. *In: Parasitológia*, v. 46(1-2): 89-93, 2004.
- RAHALISON, L. HAMBURGER, M. MONOD, M. FRENK, E. & HOSTETT-MANN, K. Antifungal test in Phytochemical investigations: Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *In: Planta Med.*, v. 60: 41-44, 1993.
- RAICHT, R.F. COHEN, L.I. FAZZINI, E.P. SARWAL, A.N. & TAKAHASHI, M. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *In: Cancer Res.*, v. 40: 403-405, 1980.
- RATTER, J.A. & DARGIE, T.C.D. An analysis of the floristic composition of 26 Cerrado areas in Brazil. *In: Edinburg J. Botany*, v. 49(2): 235-250, 1992.
- RATTER, J.A. RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *In: Annals of Botany*, v. 80(3): 223-230, 1997.
- RENNER, S.S. & HAUSNER, G. New Species of *Siparuna* (Siparunaceae) III. Three New Species and One Newly Ranked Entity from Colombia, Ecuador, and Peru. *In: Flora of Ecuador*, v. 59: 121-125, 1997.

RENNER, S.S. & WON, H. Repeated evolution of dioecy from monoecy in Siparunaceae (Laurales). *In: Syst. Biol.*, v. 50(5): 700-712, 2001.

RENNER, S.S. MURRAY, D. & FOREMAN, D. Timing transantarctic disjunctions in the Atherospermataceae (Laurales): evidence from coding and noncoding chloroplast sequences. *In: Systematic Biology*, v. 49: 579-591, 2000.

RENNER, S.S. SCHWARZBACH, A.E. & LOHMANN, L. Phylogenetic position and floral function of *Siparuna* (Siparunaceae: Laurales). *In: Plant. sci.*, v. 158: S89-S98, 1997.

RESOLUÇÃO RE 714 de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências.

REYNOLDS, T.B. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *In: Microbiology*, v. 155(Pt 5): 1386-96, 2009.

RIBEIRO, J.F. & WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO S. M. & ALMEIDA S. P. *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA – CPAC: 89-166, 1998.

RIBEIRO, V.M. & MICHALICK, M.S.M. Leishmaniose, Estratégia de Controle. *In: Nosso Clínico*, v. 4(24): 10, 2001.

RICHARDSON, M. & LASS-FLORL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *In: Clin. Microbiol. Infec.*, v. 14: 5-24, 2008.

RIOS, J.L. SIMEON, S. & VILLAR, A. Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids. *In: Fitoterapia*, v. 60(5): 387-412, 1989.

ROCHA, L.G. ALMEIDA, J.R.G.S. MACEDO, R.O. & BARBOSA-FILHO, J.M.A. Review of natural products with antileishmanial activity. *In: Phytomedicine*, v. 12: 514-535, 2005.

RODAS, L.A.C. & POLETTO, D.W. *Leishmaniose Visceral Americana. Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN*. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 2001.

RODRIGUES, A.M.S. DE PAULA, J.E. DEGALLIER, N. MOLEZ, J. & ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *In: J. Am. Mosq. Control.*, v. 22: 314-317, 2006b.

RODRIGUES, F.H. CARDOSO, S.R.A. GOMES, M.A.B. BELETTI, M.E. ROCHA, A. GUIMARÃES, A.H.B. CANDELORO, I. & SOUZA, M.A. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *In: Veterinary Parasitology*, v. 139: 37-46, 2006a.

RODRIGUES, J.C.F. ATTIAS, M. RODRIGUEZ, C. URBINA, J.A. & SOUZA, W. Ultrastructural and Biochemical alterations induced by 22,26-Azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *In: Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46: 487-499, 2002.

ROESLER, R. MALTA, L.G. CARRASCO, L.C. HOLANDA, R.B. SOUSA, C.A.S. & PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *In: Ver. Bras. Ciência e Tecnol. Alimentos*, v. 27: 53-60, 2007.

ROMERO, G.A.S. & BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America-A Systematic Review. *In: PLoS. Negl. Trop. Dis.*, v. 4(1): e584, 2010.

RÜDIGER, A.L. SILVA, C.C. & VEIGA JUNIOR, V.F. EDXRF Analysis of Amazonian Burseraceae Oleoresins. *In: J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20(6): 1077-1081, 2009.

SANO, E.E. ROSA, R. BRITO, J.L.S. & FERREIRA, L.G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *In: Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43(1): 153-156, 2008.

SANTIAGO, F. Fitossociologia da regeneração arbórea na mata de galeria do Pitoco (IBGE-DF) seis anos após fogo accidental. *In: Scientia Florestalis*, v. 67: 64-77, 2005.

SANTOS, D.O. COUTINHO, C.E. MADEIRA, M.F. BOTTINO, C.G. VIEIRA, R.T. NASCIMENTO, S.B. BERNARDINO, A. BOURGUIGNON, S.C. CORTE-REAL, S. PINHO, R.T. RODRIGUES, C.R. & CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. *In: Parasitol. Res.*, v. 103(1): 1-10, 2008.

SANTOS, S.R. RANGEL, E.T. LIMA, J.C. SILVA, R.M. LOPES, L. NOLDIN, V.F. CECHINEL FILHO, V. DELLE MONACHE, F. & MARTINS, D.T.O. Toxicological and phytochemical studies of *Aspidosperma subincanum* Mart. stem bark (Guatambu). *In: Pharmazie*, v. 64(12): 836-839, 2009.

SARKAR, A. SEN, R. SAHA, P. GANGULY, S. MANDAL, G. & CHATTERJEE, M. An ethanolic extract of leaves of *Piper betle* (Paan) Linn mediates its anti-leishmanial activity via apoptosis. *In: Parasitol. Res.*, v. 102: 1249-1255, 2008.

SCHMOURLO, G. MENDONÇA-FILHO, R.R. ALVIANO, C.S. & COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 96(3): 563-8. 2005.

SCHOFIELD, C.J. JANNIN, J. & SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *In: Trends Parasitol.*, v. 22: 583-588, 2006.

SCHULTES, R.E. & RAFFAUF, R.F. The healing Forest Medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia. *In: Portland Dioscorides Press*, v. 2: 310-311, 1990.

SCUDELLER, V. V. Bignoniaceae Juss. no Parque Nacional da Serra da Canastra - Minas Gerais, Brasil. *In: IHERINGIA, Sér. Bot. Porto Alegre*, v. 59(1): 59-73, 2004.

SEIFERT, K. MATU, S. PEREZ-VICTORIA, F.J. CASTANYS, S. GAMARRO, F. & CROFT, S.L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Agents Antimicrob.*, v. 22: 380-387, 2003.

SHARMA, U. VELPANDIAN, T. SHARMA, P. & SINGH, S. Evaluation of anti-leishmanial activity of selected Indian plants known to have antimicrobial properties. *In: Parasitol. Res.*, v. 105(5): 1287-93, 2009.

SHERLOCK, I.A. Vetores. *In: BRENER, Z. et al. Trypanossoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed, v.10: 19-40, 2000.

SHMUNIS, G.A. A Tripanosomíase Americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. *In: BRENER, Z. et al. Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed, v. 1: 1-15, 2000.

SIANI, A.C. RAMOS, M.F. MENEZES-DE-LIMA, O.J.R. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. FERNADEZ-FERREIRA, E. SOARES, R.O. ROSAS, E.C. SUSUNAGA, G.S. GUIMARÃES, A.C. ZOGHBI, M.G. & HENRIQUES, M.G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 66(1): 57-69, 1999.

SILVA- JÚNIOR, M.C. Fitossociologia e estrutura diamétrica da mata de galeria do Taquara na reserva ecológica do IBGE-DF. *In: Rev. Árvore*, v. 28(3): 419-428, 2004.

SILVA, A.S. FERREIRA, I.M. & MENDES, E.P.P. Abordagens geográficas do Cerrado: paisagens e diversidades. *In: Anais do X Simpósio Regional de Geografia* (Editoração/Anais), 2007.

SILVA, E.A.M. *Utilização de DNA p36 (lack) na indução de resposta imune e na proteção contra infecção por Leishmania chagasi em camundongos Balb/c*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

SILVA, E.M. VALENCIA, A. GROSSI-DE-SÁ, M.F. ROCHA, T.L. FREIRE, E. DE PAULA, J.E. & ESPINDOLA, L.S. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. *In: Pestic. Biochem. Phys.*, v. 95: 141-146, 2009.

SILVA, I.A. & BATALHA, M.A. Taxonomic distinctness and diversity of a hyper-seasonal savanna in central Brazil. *In: Diversity and Distributions*, v. 12(6): 725-730, 2006.

SILVA, J.M.C. & BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *In: Bio Science*, v. 52: 225-233, 2002.

SIMON, M.F. GREYER, R. DE QUEIROZ, L.P. SKEMA, C. PENNINGTON, R.T. & HUGHES, C.E. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *In: Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 106(48): 20359-20364, 2009.

SINGH, B. & SINGH, S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *In: Phytother. Res.*, v. 17: 814-816, 2003.

SINGH, N. KUMAR, A. GUPTA, P. CHAND, K. SAMANT, M. MAURYA, R. & DUBE, A. Evaluation of antileishmanial potential of *Tinospora sinensis* against experimental visceral leishmaniasis. *In: Parasitol. Res.*, v. 102: 561-565, 2008a.

SINGH, N. KUMAR, R. GUPTA, S. DUBE, A. & LAKSHMI, V. Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. In: *Parasitol. Res.*, v. 103: 351-354, 2008b.

SINGH, N. SAMANT, M. GUPTA, S.K. KUMAR, A. & DUBE, A. Age-influenced population kinetics and immunological responses of *Leishmania donovani* in hamsters. In: *Parasitol. Res.*, v. 101: 919-924, 2007.

SINGH, U.K. PRASAD, R. MISHRA, O.P. & JAYSWAL, B.P. Miltefosine in children with visceral leishmaniasis: a prospective, multicentric, cross-sectional study. In: *Indian J. Pediatr.*, v. 73(12): 1077-80, 2006.

SLAVIN, M.A. SORRELL, T.C. MARRIOTT, D. THURSKY, K.A. NGUYEN, Q. ELLIS, D.H. MORRISSEY, C.O. & CHEN, S.C. Candidaemia in adult cancer patients: risks for fluconazole-resistant isolates and death. In: *J. Antimicrob. Chemother.*, in press, 2010.

SOSA-ESTANI, S. ARMENTI, A. ARAUJO, G. VIOTTI, R. LOCOCO, B. VERA, B. R. VIGLIANO, C. RISSIO, A.M. & SEGURA, E.L. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas con Benznidazol y Acido Tioctico. In: *Medicina*, v. 64(1), 2004.

SOTO, J. TOLEDO, J. VALDA, L. BALDERRAMA, M. REA, I. PARRA, R. ARDILES, J. SOTO, J. GÓMEZ, A. MOLLEDA, F. FUENTELESZ, C. ANDERS, G. SINDERMANN, H. ENGEL, J. & BERMAN, J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. In: *Clin. Infect. Dis.*, v. 44(3): 350-6, 2007.

SOUSA, P.J.C. ROCHA, J.C.S. PESSOA, A.M. ALVES, L.A.D. & CARVALHO, J.C.T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. In: *Braz. J. Pharmacogn.*, v. 15(1): 2005.

SOUZA, M.T. *Estudos fitoquímicos e Avaliação da atividade biológica de Microsporium gypseum* RADLK. Dissertação de Mestrado, Universidade do vale do Itajaí, 2006.

SOUZA, P.F. *Terminologia florestal: glossário de termos e expressões florestais*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1973.

SUNDAR, S. & RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. In: *Clin. Diagn Lab. Immun.*, v. 9(5): 951-958, 2002.

SUNDAR, S. CHAKRAVARTY, J. AGARWAL, D. RAI, M. & MURRAY, H.W.M.D. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. In: *N. Engl. J. Med.*, v. 362(6): 2010.

SUNDAR, S. JHA, T.K. & THAKUR, C.P. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. In: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 100(1): 26-33, 2006.

TEIXEIRA, A.R. NASCIMENTO, R. & STURM, N.R. Evolution and Pathology in Chagas disease. In: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101: 463-491, 2006.

TEMPONE, A.G. TREIGER BORBOREMA, S.E. DE ANDRADE, J.R. DE AMORIM GUALDA, N.C. YOGI, A. SALERNO CARVALHO, C. BACHIEGA, D.

LUPO, F.N. BONOTTO, S.V. & FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *In: Phytomedicine*, v. 12: 382-390, 2005.

THEISZOVÁ, M. JANTOVÁ, S. DRAGÚNOVÁ, J. GRZNÁROVÁ, P. & PALOU, M. Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells. *In: Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech Repub.*, v. 149(2): 393-396, 2005.

TRIGO, J. ABBEHUSEN, M. NETTO, E.M. NAKATANI, M. PEDRAL-SAMPAIO, G. DE JESUS, R.S. GOTO, Y. GUDERIAN, J. HOWARD, R.F. & REED, S.G. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. *In: Vaccine*, [Epub ahead of print], 2010.

TRIPATHI S, SINGH N, SHAKYA S, DANGI A, MISRA-BHATTACHARYA S, DUBE, A. & KUMAR, N. Landrace/gender based differences in phenol and thiocyanate contents and biological activity in *Piper betle* L. *In: Curr. Sci.*, v. 91: 746-749, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T. MENDONÇAFILHO, R.R. DÍAZ, J.A.M. MAZA, P.K. DIAS-FILHO, B.P. CORTEZ, D.A.G. ALVIANO, D.S. ROSA, M.S.S. LOPES, A.H.C.S. ALVIANO, C.S. & NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *In: Parasitol. Int.*, v. 55: 99-105, 2006.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *In: Acta Trop.*, in press, 2009.

VALVERDE, S.S. MACHADO, T.B. LEITÃO, G.G. & MONACHE, F.D. Alcalóides e flavonoides de *Siparuna apiosyce*. *In: Simpósio De Plantas Medicinais do Brasil 14*, Florianópolis, Resumos, 174 res. Q- 023, 1996.

VENDRAMETTO, M.C. SANTOS, A.O. NAKAMURA, C.V. FILHO, B.P. CORTEZ, D.A. & UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoide-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. *In: Parasitol. Int.*, in press, 2010.

VIEIRA, N. RANGEL, E.T. SOUSA, D.P. PAULA, J.E. MAGALHAES, A.V. & ESPINDOLA, L.S. Efeitos de Extratos Vegetais do Cerrado sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) brasiliensis*. *In: 38 Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica e Experimental*, Ribeirão Preto, 2006.

VIEIRA, N.C. ESPÍNDOLA, L.S. SANTANA, J.M. VERAS, M.L. PESSOA, O.D.L. PINHEIRO, S.M. DE ARAÚJO, R.M. LIMA, M.A.S. & SILVEIRA, E.R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. *In: Bioorgan. Med. Chem.*, v. 16(4): 1676-1682, 2008.

WEBSTER, D. TASCHEREAU, P. BELLAND, R.J. SAND, C. & RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts preliminary screening studies. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 115: 140-146, 2008.

WENIGER, B. ROBLEDO, S. ARANGO, G.J. DEHARO, E. ARAGON, R. MUÑOZ, V. CALLAPA, J. LOBSTEIN, A. & ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *In: J. Ethnopharmacol.*, v. 78: 193-200, 2001.

WHO/TDR 2005 - Leishmaniasis - Seventeenth Programme Report | Progress 2003-2004 19-23, 2005.

WILSON, A.P. *Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 3rd ed. (ed. Masters, J. R. W.) 1, 2000.

ZAIDENBERG, A. TOURNIER, H.A. SCHINELLA, G.R. & BUSCHIAZZO, H.O. *Trypanossoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *In: Ver. Latinoamericana de Microbiol.*, v. 42: 21-26, 2000.

ZANONI, T.B. CARLOS, I.Z. TOGNOLLI, J.O. YAMANAKA, H. & FERREIRA, A.A.P. Optimizaçãõ of ELISA using Tc85-11 protein and factorial design. *In: Ecl. Quim.*, v. 31(91): 63-72, 2006.

ZHOU, B.N. BAJ, N.J. GLASS, T.E. MALONE, S. WERKHOVEN, M.C.M. VAN TROON, F. DAVID WISSE, J.H. & KINGSTON, D.G.I. Bioactive Labdane Diterpenoids from *Renealmia alpinia* Collected in the Suriname Rainforest. *In: J. Nat. Prod.*, v. 60: 1287-1293, 1997.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 18 de abril de 2006.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**AÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS VEGETAIS SOBRE LEISHMANIA SSP.**”
sponsabilidade da Profa. Laila Salmen Espindola, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de
as Biológicas da Universidade de Brasília.


Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA

Anexo I - Declaração do Comitê de ética

Triagem Farmacológica Geral

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Experimento: Teste Hipocrático - Observação Geral

Projeto: _____

Prof. Responsável: _____

Data: ___/___/___ Experimentador: _____

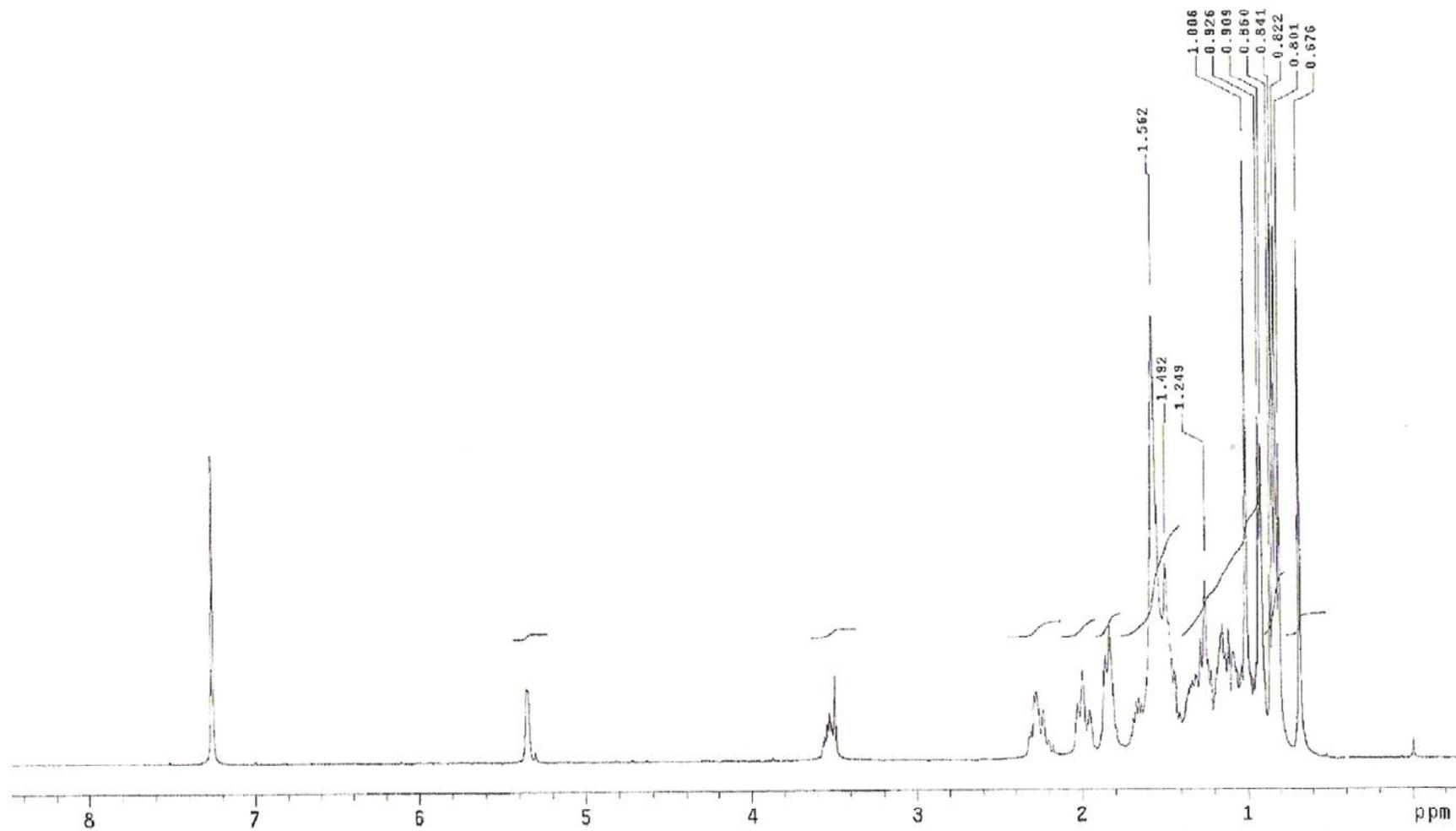
Animal: _____ Sexo: _____

Idade: _____ Temp. Ambiental: _____ °C

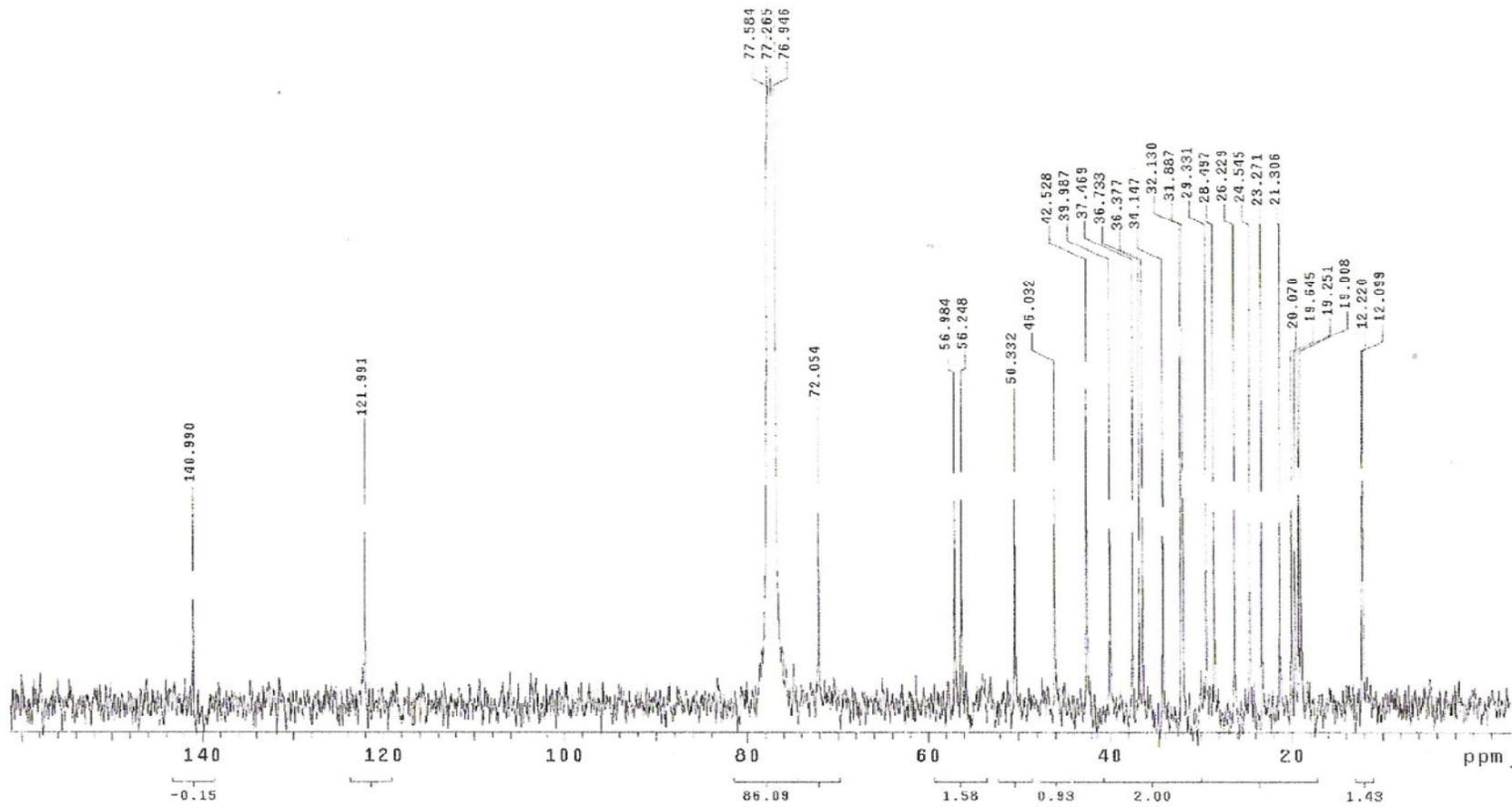
Tratamento:

Obs.	10'	30'	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
CONTORÇÕES ABDOMINAIS									
PELOS ARREPIADOS (SNAS)									
PTOSE PALPEBRAL									
LOCOMOÇÃO									
AMONTÓADOS NO CANTO (HIPOTERMIA)									
TÔNUS MUSCULAR									
TREMORES									
PARALISIA DO TREM POSTERIOR									
SALIVAÇÃO									
CROMADOCRRIORRÉIA									
SECREÇÃO BRÔNQUICA									
CONVULSÕES									
OUTRAS MANIFESTAÇÕES									
MORTE									

Anexo II – Tabela de Malone adaptada



Anexo III - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do esteróide β - sitosterol



Anexo IV - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do esteróide β -sitosterol