



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS  
VEGETAIS CONTRA *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS*  
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) E ANÁLISE  
DE FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS DE *CAESALPINIA  
FERREA MARTIUS* (FABALES: CAESALPINIACEAE)**

**NÍVEA MARIA SIMÕES FALCÃO**

**MANAUS, 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA DA SAÚDE**

**NÍVEA MARIA SIMÕES FALCÃO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS  
VEGETAIS CONTRA *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS*  
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) E ANÁLISE  
DE FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS DE *CAESALPINIA  
FERREA MARTIUS* (FABALES: CAESALPINIACEAE)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre no Programa de Mestrado em Ciência da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Antônia Maria Ramos Franco**

**Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cecilia Veronica Nunez**

**MANAUS, 2010**

**NÍVEA MARIA SIMÕES FALCÃO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS  
VEGETAIS CONTRA *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS*  
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) E ANÁLISE DE  
FRAÇÕES SEMI-PURIFICADAS DE *CAESALPINIA FERREA*  
MARTIUS (FABALES - CAESALPINIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Universidade Federal do Amazonas  
como parte do requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciência da Saúde na área de  
concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Antônia Maria Ramos Franco, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Pierre Alexandre dos Santos, Membro Externo  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sônia Rolim Reis, Membro Externo  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

## *Dedicatória*

*Aos meus pais, Newton e Noelia, que são as pessoas mais importantes da minha vida, que acreditaram em meu potencial incentivando e acompanhando-me em mais essa jornada de minha vida profissional, dando-me força, coragem e exemplo para nunca desistir.*

*Á minha irmã, Nádia que sempre me apoiou, estando presente nos momentos mais difíceis e, principalmente pelo amor fraterno.*

*Ao meu Avô Carlos que aonde quer que ele esteja, sem dúvida sempre esteve presente em todas as minhas vitórias e agora deve estar orgulhoso por mais uma conquista em minha vida.*

*Á uma pessoa especial, Dra .Jerusa de Souza Andrade, a qual deu-me a oportunidade de ingressar na carreira científica através do Programa de Apoio à Iniciação Científica (PIBIC) dando-me base suficiente para chegar aonde cheguei!  
Obrigada pelos eternos e inesquecíveis ensinamentos!*

## *Agradecimentos*

- ✓ *Agradeço primeiramente a Deus, Criador de tudo, pelo dom da vida, responsável pela beleza e biodiversidade complexa da natureza, a qual exaustivamente tentamos compreender. Todos os dias, ao levantar agradeço por estar sempre comigo e assim conseguir realizar todas as minhas conquistas já vividas. Obrigada!*
- ✓ *Á minha família, que sempre esteve presente dando-me toda a compreensão necessária, amor e apoio necessário para que pudesse vencer os obstáculos do dia-a-dia;*
- ✓ *Á minha Orientadora, Dra. Antonia Maria Ramos Franco, por ter me recebido desde o Programa de Iniciação Científica em seu Laboratório, que tem me orientado no caminho certo e ajudado em meu crescimento tanto profissional quanto pessoal;*
- ✓ *Á minha Co-orientadora, Dra. Cecília Verônica Nunez, por receber-me em seu laboratório no momento em que mais precisei, ajudando-me a recuperar o tempo perdido. Obrigada pela total colaboração, ensinamentos e confiança depositada em minha pessoa;*
- ✓ *Ao Dr. Pierre Alexandre dos Santos pelos ensinamentos e parceria na execução de diversos trabalhos no Laboratório de Bioprospecção e por ter aceitado participar da banca de Mestrado;*
- ✓ *Á MSc. Luanda de Paula Figueira pelos ensinamentos e colaboração na identificação das espécies de Leishmania no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (CPCS);*
- ✓ *Á MSc. Francimeire Pinheiro por ajudar-me e passar seu conhecimento sobre a Leishmaniose com muita dedicação e paciência desde o meu segundo PIBIC. Obrigada pela amizade e dedicação nos ensinamentos diários!*
- ✓ *Á Dra. Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira por ter participado*

- de minha aula de qualificação e com seu conhecimento, aconselhou-me sobre as devidas mudanças que precisava fazer em minha dissertação de mestrado para a melhoria da mesma;*
- ✓ *Á Dra. Sônia Rolim Reis por ter aceitado participar de minha aula de qualificação e agora novamente de minha banca de dissertação de mestrado. Obrigada pelas idéias construtivas!*
  - ✓ *Á química Lorena Mayara de Carvalho Cursino pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos práticos no Laboratório de Bioprospecção e pela paciência. Agradeço muito todos os dias por ter uma amiga companheira como você! Obrigada por tudo!*
  - ✓ *Á MSc. Daiane da Veiga pela amizade e companheirismo nas horas mais difíceis. Obrigada pelo apoio!*
  - ✓ *Á mestranda Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowsk pela compreensão e ensinamentos durante o procedimento prático o qual utilizamos o aparelho de Ressonância Magnética Nuclear. Obrigada pelos dias de acompanhamento e pela amizade sincera!*
  - ✓ *Aos graduandos de Zootecnia (UFAM) Alana e Alen, pela eterna amizade e companheirismo nas horas mais difíceis na execução do bioensaio. Agradeço todos os dias por ter amigos como vocês ao meu lado!*
  - ✓ *Á MSc. Ana Cláudia Alvez Cortez pela compreensão de a qualquer momento poder atender-me para tirar dúvidas sobre o bioensaio. Obrigada por ser tão paciente e mostrar-me o melhor caminho a seguir!*
  - ✓ *Á equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (CPCS) e á equipe do Laboratório de Bioprospecção (CPPN). Obrigada pela oportunidade de trabalhar com pessoas tão especiais, competentes e compreensivas como vocês!*
  - ✓ *Á secretária de pós-graduação em Ciência da Saúde (UFAM) a qual sempre agilizou assuntos burocráticos referentes ao meu mestrado;*
  - ✓ *Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*

*(CNPq) pelo suporte financeiro;*

- ✓ *Á Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) que proporcionou a minha participação em congressos nacionais;*
- ✓ *Enfim, obrigada a todos que tornaram esse trabalho possível, direta ou indiretamente.*

## RESUMO

A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das cinco doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância. A busca por agentes leishmanicidas com poucos efeitos colaterais é um dos maiores desafios na pesquisa moderna, e cada vez mais está relacionada aos usos de plantas medicinais e outros produtos naturais. A espécie *Caesalpinia ferrea* Martius largamente distribuída no Brasil, é usada popularmente para muitos fins terapêuticos, inclusive no tratamento de diversas infecções como as causadas pela Leishmaniose, tornando-a promissora para a realização de ensaios de atividade biológica contra a *leishmania*. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar, através de bioensaios, a atividade de extratos hexânicos e metanólicos contra protozoários, analisando também frações semi-purificadas obtidas do extrato de melhor atividade leishmanicida. Os frutos de *C. ferrea* foram coletados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Campus do V8 na Cidade de Manaus-AM, e processados nos departamentos de Produtos Naturais e de Leishmaniose e Doença de Chagas no INPA. Os estudos foram realizados com os frutos inteiros e suas partes separadas, epicarpos e sementes. Foram preparados extratos brutos hexânicos, e metanólicos a partir dos frutos inteiros e também das partes separadas, epicarpos e sementes, os quais foram submetidos aos ensaios para avaliação da atividade biológica *in vitro* contra formas promastigotas da fase estacionária de protozoários da espécie *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Os extratos brutos foram analisados através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinação do perfil cromatográfico. Todos os ensaios biológicos foram realizados experimentalmente *in vitro*, em microplacas contendo  $10^6$ /mL formas promastigotas de culturas axênicas de *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/IM 4147) avaliando-se a atividade inibitória ou ativadora de crescimento parasitário. O extrato bruto de melhor atividade biológica foi submetido à CCDC e fracionamento por partição líquido-líquido obtendo-se frações semi-purificadas que foram avaliadas quanto a sua composição química. Os resultados mostraram que o extrato metanólico do epicarpo de *C. ferrea*, apresentou atividade leishmanicida para *L. (V.) guyanensis* na concentração de 20 mg/mL/24h. No entanto, ao contrário das expectativas, houve um efeito estimulante em *L. (V.) guyanensis* pelo extrato hexânico obtido das sementes de frutos de *C. ferrea*. Analisando quimicamente o extrato metanólico de frutos e epicarpos, os quais demonstraram atividade leishmanicida, verificou-se a presença de substâncias como a clorofila, flavonóides, xantonas, taninos, triterpenos e saponinas como constituintes majoritários, além de apresentar atividade antioxidante. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos metanólicos de frutos e epicarpos de *C. ferrea* podem ser considerados como importantes alternativas no tratamento das leishmanioses, devendo ser realizado testes farmacológicos e toxicológicos *in vivo* desses extratos, realizando outros fracionamentos a fim de se confirmar alguma substância de melhor atividade leishmanicida.

**Palavras chave:** *Caesalpinia ferrea* Mart., *Leishmania (Viannia) guyanensis*, Bioensaio, Análise Fitoquímica.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a world public health problem wide considered by the World Health Organization as one of five infectious endemic diseases of major relevancy. The search for leishmanicidal agents with fewer side effects is one of the greatest challenges in modern research, and is increasingly related to the uses of medicinal plants and other natural products. The species *Caesalpinia ferrea* Martius widely distributed in Brazil it is popularly used for many therapeutic purposes, including the treatment of various infections like those caused by leishmaniasis, making it a promising tests of biological activity against *leishmania*. The objective of this study was to evaluate by bioassays the activity of hexane and methanol extracts against protozoa, analyzing semi-purified fractions obtained from the most active. The fruits of *C. ferrea* were collected at the National Institute of Amazon Research, V8's Campus in the City of Manaus - AM and processed in the departments of Natural Products and leishmaniasis and Chagas Diseases at INPA. The studies were performed with the whole fruit and its separate parts, coconut shell and seed. Hexane e methanol crude extracts were prepared from the fruits, coconut shell and seeds, which were tested to evaluate the biological activity *in vitro* against promastigotes of the stationary phase of the protozoan *Leishmania (Viannia) guyanensis*. The extracts were analyzed by thin layer chromatography Comparison (CCDC) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to determine the chromatographic profile. All biological assays were carried out experimentally *in vitro* in microplates containing  $10^6$ /mL promastigotes to axenic cultures of *L. (V.) guyanensis* evaluating the inhibitory activity and stimulating parasite growth. The most active crude extract was submitted to CCDC and fractionation by partition liquid-liquid resulting in semi-purified fractions that were evaluated for their chemical composition. The results showed that the epicarp methanolic extract of *C. ferrea*, showed anti-leishmanial activity for *L. (V.) guyanensis* in the concentration of 20 mg/mL/24h. However, contrary to expectations, there was a stimulatory effect on *L. (V.) guyanensis* by the hexanic extract obtained from the fruit seed of *C. ferrea*. Chemically analyzing the coconut shell and fruits methanolics extracts of, which showed anti-leishmanial activity, we verified the presence of substances such as chlorophyll, flavonoids, xanthonenes, tannins, triterpenes and saponins as major constituents, and shows antioxidant activity. The results showed that the methanolics extracts of coconut shell and fruitsof *C. ferrea* can be considered as an promising alternative in the treatment of cutaneous leishmaniasis and should be undertaken pharmacological and toxicological tests *in vivo* of extract, making other fractioning in order to isolate the substances responsible for the anti-leishmanial activity.

**Keywords:** *Caesalpinia ferrea* Mart., *Leishmania (Viannia) guyanensis*, bioassays, Phytochemical Analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. ....	08
<b>Figura 2</b>	Drogas de primeira escolha utilizadas no tratamento da leishmaniose.....	16
<b>Figura 3</b>	Drogas de segunda escolha utilizadas no tratamento da leishmaniose..	17
<b>Figura 4</b>	Imagens de <i>Caesalpinia ferrea</i> Martius (folhas, flores, árvore, fruto íntegro e troco, respectivamente).....	22
<b>Figura 5</b>	Imagens da árvore e do tronco com identificação de <i>C. ferrea</i> na qual foram coletados os frutos íntegros. ....	28
<b>Figura 6</b>	Procedimento de extração do material vegetal e obtenção dos extratos brutos.....	30
<b>Figura 7</b>	Preparação do inóculo de formas promastigotas para a realização de testes biológicos contra <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> .....	32
<b>Figura 8</b>	Procedimentos esquemáticos do preparo dos extratos brutos para ensaios de atividade biológica .....	33
<b>Figura 9</b>	Ensaio biológico para avaliação da atividade <i>in vitro</i> de extratos de <i>C. ferrea</i> para <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> .....	35
<b>Figura 10</b>	Partição com solventes de polaridades crescente .....	39
<b>Figura 11</b>	Curva de crescimento de <i>L. (V.) guyanensis</i> em cultivo axênico meio RPMI 1640 completo no período de até 72 horas .....	46
<b>Figura 12</b>	Avaliação da atividade do extrato metanólico de frutos íntegros de <i>C. ferrea</i> contra formas promastigotas de <i>L. (V.) guyanensis</i> – contagem de formas promastigotas viáveis (24, 48 e 72 horas).....	49
<b>Figura 13</b>	Atividade do extrato metanólico dos epicarpos de <i>C. ferrea</i> contra <i>L. (V.) guyanensis</i> – contagem de formas promastigotas viáveis .....	51
<b>Figura 14</b>	Atividade do extrato metanólico de sementes de <i>C. ferrea</i> contra <i>L. (V.) guyanensis</i> – contagem de formas promastigotas viáveis.....	51
<b>Figura 15</b>	Atividade do extrato hexânico das sementes de <i>C. ferrea</i> contra <i>L. (V.) guyanensis</i> – contagem de formas promastigotas viáveis.....	52

<b>Figura 16</b>	Atividade do extrato metanólico e hexânico de sementes de <i>C. ferrea</i> contra <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> numa concentração de 20mg/mL.....	53
<b>Figura 17</b>	Atividade do extrato metanólico de diferentes partes de <i>C. ferrea</i> contra <i>L.(V.) guyanensis</i> numa concentração de 20mg/mL.....	54
<b>Figura 18</b>	Cálculo da DL <sub>50</sub> de extrato metanólico obtido do fruto de <i>Caesalpinia ferrea</i> para <i>L.(V.) guyanensis</i> .....	55
<b>Figura 19</b>	Cálculo da DL <sub>50</sub> de extrato metanólico obtido do epicarpo de <i>Caesalpinia ferrea</i> para <i>L.(V.) guyanensis</i> .....	56
<b>Figura 20</b>	Gráfico de tendência de sensibilidade (tS=PSc./PSe.) às 24, 48 e 72 horas aos extratos obtidos de frutos, epicarpós e sementes de <i>C. ferrea</i> para <i>L.(L.) guyanensis</i> .....	57
<b>Figura 21</b>	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) de extratos hexânicos eluidos com Hex: Acetato de Etila (7:3).....	59
<b>Figura 22</b>	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) de extratos metanólicos eluidos com DCM e MeOH (3:7).....	61
<b>Figura 23</b>	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) de extratos metanólicos eluidos com DCM e MeOH (1:1).....	62
<b>Figura 24</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 60 MHz em CDCl <sub>3</sub> do extrato hexânico do fruto de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	63
<b>Figura 25</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 60 MHz em CDCl <sub>3</sub> do extrato hexânico da semente de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	64
<b>Figura 26</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 60 MHz em CDCl <sub>3</sub> do extrato hexânico de epicarpo de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	65
<b>Figura 27</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 60 MHz em CDCl <sub>3</sub> do extrato metanólico de fruto de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	66
<b>Figura 28</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 60 MHz em CDCl <sub>3</sub> do extrato metanólico de semente de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	67
<b>Figura 29</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 60 MHz em CDCl <sub>3</sub> do extrato metanólico de epicarpo de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	68

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Rendimento dos Extratos Brutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> .....	44
<b>Tabela 2</b>	Prospecção Fitoquímica dos Extratos Brutos de <i>Caesalpinia ferrea</i> ....	69

## LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>BR</b>	Brasil
<b>CCDC</b>	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
<b>CPCS</b>	Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde
<b>DL</b>	Dose Letal Média
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>E</b>	Epicarpos
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>EH</b>	Extratos Hexânicos
<b>EHFI</b>	Extratos Hexânicos de Frutos Íntegros
<b>EHS</b>	Extratos Hexânicos de Sementes
<b>EHE</b>	Extratos Hexânicos de Epicarpos
<b>EM</b>	Extratos Metanólicos
<b>EMFI</b>	Extratos Metanólicos de Frutos Íntegros
<b>EMS</b>	Extratos Metanólicos de Sementes
<b>EME</b>	Extratos Metanólicos de Epicarpos
<b>et al.</b>	Colaboradores
<b>FI</b>	Frutos Íntegros
<b>IDRM</b>	Intradermorreação de Montenegro
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IM</b>	INPA-Manaus
<b>IV</b>	Intravenoso
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon Potássio
<b>L. (V.)</b>	<i>Leishmania (Viannia)</i>
<b>L.(L.)</b>	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose Cutânea Difusa
<b>LD</b>	Leishmaniose Difusa
<b>LMC</b>	Leishmaniose Muco-cutânea
<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>m</b>	Minutos
<b>MHOM</b>	Mammália Homo Sapiens
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>m/v</b>	Massa sobre Volume
<b>NNN</b>	Novy-McNeal- Nicolle

<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PSc</b>	Promastigotas controles
<b>PSe</b>	Promastigotas experimentais
<b>Rf</b>	Fator de Retenção
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>S</b>	Sementes
<b>Sb + 5</b>	Antimônio Pentavalente
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SFBi</b>	Soro Fetal Bovino Inativado
<b>Spp.</b>	Espécies
<b>ST</b>	Segmentos em Eletrocardiograma
<b>TS</b>	Tendência da Sensibilidade
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>W. Gr.</b>	Longitude Oeste de Greenwich
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Graus Célsius

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	02
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	06
2.1 A Leishmaniose Tegumentar Americana .....	06
2.2 Diagnóstico e Tratamento .....	14
2.3 Atividade Leishmanicida Encontrada nas Plantas .....	19
2.4 O vegetal <i>Caesalpinia ferrea</i> Martius.....	21
2.4.1 Aspectos Etnofarmacológicos e Farmacológicos da <i>C. ferrea</i> .....	23
2.4.2 Aspectos Fitoquímicos de <i>C. ferrea</i> .....	25
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	26
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos.....	26
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	27
4.1 Modelo de Estudo.....	27
4.2 Universo de Estudo.....	27
4.2.1 Material Vegetal.....	27
4.2.2 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão.....	28
4.3 Procedimentos .....	29
4.3.1 Obtenção dos Extratos Brutos .....	29
4.3.2 Cultivo Parasitário e Preparação do Inóculo.....	31
4.3.3 Preparação dos Extratos Brutos para os Testes Biológicos <i>in vitro</i> .....	32
4.4 Bioensaios: Avaliação da Atividade <i>in vitro</i> .....	33
4.5 Critérios Quantitativos de Avaliação dos Experimentos com <i>Leishmania</i> <i>(Viannia) guyanensis</i> .....	36
4.5.1 Estabelecimento do Percentual de Sobrevivência .....	36
4.5.2 Cálculo da “Tendência” de Sensibilidade .....	36
4.5.3 Cálculo da DL <sub>50</sub> (Dose Letal Média) .....	37
4.6 Avaliação do Perfil Cromatográfico .....	37
4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	37
4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	38
4.7 Fracionamento do Extrato Metanólico de Epicarpo de <i>C. ferrea</i> .....	39
4.8 Análise Estatística dos Resultados .....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	41
5.1 Rendimentos na Obtenção dos Extratos Brutos de <i>C. ferrea</i> .....	44
5.2 Ensaios Biológicos dos Extratos Brutos contra <i>Leishmania (Viannia)</i> <i>guyanensis</i> – Ensaio <i>in vitro</i> .....	46
5.2.1 Curva de Crescimento de <i>L. (V.) guyanensis</i> .....	46
5.2.2 Padronização dos Ensaios Biológicos com <i>L. (V.) guyanensis</i> .....	47

5.2.3 Ensaio Biológico com <i>L.(V.) guyanensis</i> .....	48
5.2.4 Avaliação da Atividade do Extrato Metanólico do fruto Íntegro de <i>C. ferrea</i> .....	48
5.2.5 Avaliação da Atividade do Extrato Metanólico dos Epicarpos de <i>C. ferrea</i> .....	50
5.2.6 Avaliação da Atividade do Extrato Metanólico e Hexânico das Sementes de <i>C. ferrea</i> .....	51
5.3 Avaliação do Perfil Cromatográfico .....	58
5.3.1 Análise dos Extratos Hexânicos .....	58
5.3.2 Análise dos Extratos Metanólicos .....	60
5.4 Análise de Espectros Provenientes de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	63
5.4.1 Análise dos Espectros de Extratos Hexânicos .....	63
5.4.2 Análise dos Espectros de Extratos Metanólicos .....	66
5.5 Prospecção Fitoquímica .....	69
<b>CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das cinco doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância (OMS, 1990). Caracteriza-se por um grupo de doenças polimórficas, causadas por protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) que no Brasil são transmitidos ao homem e a outros mamíferos através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia* spp (Diptera, Psychodidae). A doença tem apresentações clínicas diversas, podendo acometer a pele, as mucosas e as vísceras. No Brasil, existem oito espécies distintas do parasito sendo que, destas, sete (*Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) linderbergi*) são responsáveis pelas formas cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e difusa (LD) – sendo essas formas compreendidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – e uma espécie (*L. (L.) chagasi* = *L. (L.) infantum*) responsável pela forma visceral (LV) (GENARO e MICHALICK, 2005; GENARO e REIS, 2005a; SILVEIRA *et al.*, 2002).

No Amazonas, o grau de exposição dos indivíduos à leishmaniose está relacionado aos processos de ocupação desordenada podendo causar diferentes manifestações clínicas em humanos. Cerca de 60% dos casos de leishmaniose que ocorrem no Brasil estão na região da Amazônia brasileira. Entre os estados dessa região, o Amazonas é o segundo mais atingido por casos da LTA, estando atrás somente do Pará (MS, 2009). Segundo a Fundação de Vigilância em Saúde, Manaus é considerada como o município com maior número de casos da LTA. Naiff (1998), examinando um total de 108 pacientes oriundos do estado do Amazonas, verificou que 86 (77,4%) destes apresentavam a doença causada por *L. (V.)*

*guyanensis*. Romero e cols (2001), analisando a frequência de infecção humana por *L.(V.) braziliensis* em quatro dos municípios ao norte do Rio Amazonas (Manaus, Itacoatiara, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo), mostraram infecção por *L. (V.) guyanensis* em 97% (69/71) dos casos.

Apesar dos grandes progressos feitos na compreensão da bioquímica e biologia molecular do parasito, os tratamentos de primeira escolha para muitas formas de Leishmaniose ainda são injeções diárias de antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2007), como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de Sódio (Pentostan) (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Alternativamente, o antibiótico Anfotericina B e a diamina aromática (Pentamidina) são utilizadas clinicamente no tratamento das formas mucocutâneas graves ou em situações onde a LTA não responde ao tratamento com antimoniais (DEDET e PRATLONG, 2003). Conseqüentemente, o tratamento é um desafio porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz. Ambos os tratamentos apresentam resistência medicamentosa, além de uma toxicidade intolerável nas doses terapêuticas eficazes, inconveniência da via de administração (intramuscular ou endovenosa) e ainda o alto custo (SANDS *et al.*, 1985). Os diversos efeitos colaterais e a resistência aos fármacos existentes, bem como o aumento de novos casos, têm favorecido a busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento da Leishmaniose (MESQUITA *et al.*, 2005).

Em todos os continentes e em todas as sociedades ocorre a utilização da fitoterapia para o tratamento das mais variadas patologias (ALEXANDRE, 2004). Praticamente toda a Medicina Tradicional, qualquer que seja o grupo étnico em consideração, baseia-se no uso de plantas (OMS, 2002). Mais de 13.000 plantas são mundialmente usadas (ELISABETSKY e SOUZA, 2003) já conforme as estimativas, cerca de 30.000 - 70.000 espécies têm sido usadas em sistemas terapêuticos (MUKHERJEE, 2006).

A grande extensão da Amazônia e sua posição no Trópico Úmido conferem à região potencial energético e econômico de alta relevância. A Floresta Amazônica abriga a mais notável e diversificada fonte de produtos naturais. Atualmente, a busca de novas substâncias bioativas em plantas tropicais é a esperança mais concreta para a cura de diversos males e um dos caminhos mais promissores para a criação de novos medicamentos (GOTTLIEB, 1990).

Espécies vegetais vêm contribuindo de forma significativa no fornecimento de metabólitos secundários, muitos desses de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Diversos desses metabólitos constituem-se em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos (procaína, a cloroquina e a tropicamida) ou de fármacos imprescindíveis (vimblastina, vincristina e podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, taxol, camptotecina e derivados) (PINTO *et al.*, 2002). A população que vive dentro ou perto da floresta conhece muitas espécies úteis, porém esse conhecimento, em geral, é restrito e pouco divulgado. Desta forma, muitas espécies são, e talvez continuem para sempre, desconhecidas devido à diminuição das florestas e a descaracterização das populações tradicionais (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Os diversos efeitos colaterais e a resistência aos fármacos existentes, bem como o aumento de novos casos, têm despertado para a urgência na busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento da Leishmaniose (MESQUITA *et al.*, 2005). Nesse contexto, considerando a existência da biodiversidade brasileira, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta e o seu potencial como fonte de biomoléculas, com diversidade de estruturas e propriedades físico-químicas e biológicas a serem exploradas, o presente trabalho de pesquisa propôs o estudo de frutos da espécie vegetal *Caesalpinia ferrea*, acreditando que a mesma pode apresentar efeitos promissores como alternativa no tratamento contra a Leishmaniose.

Um estudo realizado por CORTEZ (2004) revelou que o extrato metanólico dos frutos de *C. ferrea* apresentou atividade leishmanicida contra a *L. (V.) guyanensis*. A presente dissertação se propõe a aprofundar esse conhecimento sobre os extratos brutos e as frações semi-purificadas de frutos de *C. ferrea*, realizando testes biológicos *in vitro* desses extratos contra as formas promastigotas do parasito causador da doença no Amazonas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que são transmitidos ao homem e a outros mamíferos através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia* spp (Diptera: Psychodidae). A doença apresenta formas clínicas diversas, podendo acometer a pele, as mucosas e as vísceras. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente (GENARO e MICHALICK, 2005; BRASIL, 2007). Na maioria das vezes, o homem se infecta ao alterar o ambiente interpondo-se ao ciclo silvestre ao penetrar nesse ecossistema (LAINSON, 1985). Os flebotomos são conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. As espécies incriminadas como vetores pertencem a diferentes gêneros: *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo), são hematófagas e, ao realizarem repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerem as formas amastigotas, que no seu tubo digestivo evoluem para as formas infectantes, as promastigotas metacíclicas (MS, 2000).

Sabendo-se disso, as leishmanias apresentam duas formas evolutivas principais: uma flagelada ou promastigota que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados, e outra sem flagelo livre ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, obrigatoriamente considerado um parasito intracelular. Após o repasto sanguíneo infectante, os parasitos alcançam o intestino médio do inseto, são envolvidos por uma membrana quitinosa, chamada matriz peritrófica, dentro da qual se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Em alguns dias, transformam-se em formas promastigotas delgadas e longas, que rompem a matriz peritrófica, se fixam às vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do tubo digestivo, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicas. Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo (MICHALICK, 2005). Sendo assim, quando o inseto volta a se alimentar em hospedeiro suscetível, as formas promastigotas são regurgitadas e introduzidas através da picada, juntamente com a saliva do vetor, que parece ter papel importante na sobrevivência do parasito, no início da infecção (TITUS e RIBEIRO, 1988). Os promastigotas são internalizados através de endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. As leishmanias apresentam os lipofosfolípidos, que interferem nas funções das células macrofágicas e dendríticas, e a proteína de membrana metaloprotease gp63, a qual as protege da lise mediada pelo sistema complemento e facilita sua entrada nos macrófagos (MURRAY *et al.*, 2005). Dentro do fagolisossomo, os promastigotas se transformam em amastigotas, os quais são capazes de controlar o pH do vacúolo digestivo e se multiplicarem por divisão binária. Na ausência de controle parasitário da célula hospedeira, esta se rompe e os amastigotas liberados são internalizados por outros macrófagos (MICHALICK, 2005).

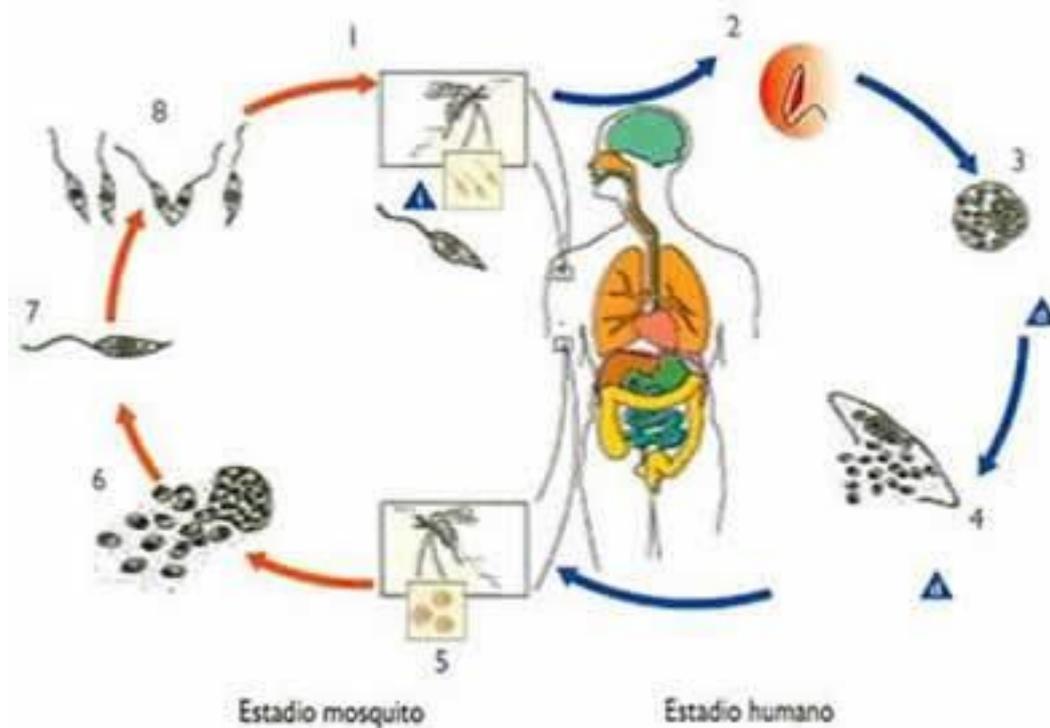


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Os flagelados causadores da leishmaniose foram agrupados em dois sub-gêneros, *Viannia* e *Leishmania*, baseados em caracteres biológicos, bioquímicos e imunológicos – associados aos critérios clássicos de morfologia, desenvolvimento biológico nos hospedeiros e em meio de cultura e distribuição geográfica (LAINSON e SHAW, 1978, 1987). Dentre as diversas espécies de *Leishmania* encontradas nas florestas do Estado do Amazonas (TALHARI *et al.*, 1988), a *L. (V.) guyanensis*, parece limitar-se à região situada ao norte dos rios Negro e Amazonas e nessa área é responsável pela maioria dos casos de LTA (LAINSON *et al.*, 1981). Esta espécie, comumente isolada neste Estado, tem como vetores *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* e *L. (Nyssomyia) anduzei* (ARIAS e FREITAS, 1977).

As Leishmanioses apresentam diferentes quadros clínicos, dependendo da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do indivíduo infectado. Na Amazônia, a leishmaniose

tegumentar americana está agrupada sob três diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose mucosa (GUERRA, 2006).

- **Leishmaniose Cutânea (LC):** As principais espécies causadoras da leishmaniose cutânea no Brasil são: *L.(V.) braziliensis*, *L(L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L(V.) naiffi*. A lesão cutânea primária desenvolve-se no local da picada após um período de incubação médio de 30 dias, podendo variar de dias a anos. Inicialmente, surge uma lesão eritemato-papulosa, única ou múltipla, evoluindo para pápulo-pustulosa, posteriormente ulcero-crostosa e finalmente assumindo o aspecto característico de úlcera de contornos circulares, bordas infiltradas, em moldura, indolor e fundo com granulações grosseiras. Infecção bacteriana associada causando dor no local pode ocorrer, produzindo exsudato seropurulento formando crostas recobrando total ou parcialmente o fundo da úlcera. Adicionalmente, a infecção secundária e o uso de produtos tópicos podem causar eczema na pele ao redor da úlcera, modificando seu aspecto (forma ectimóide) (GONTIJO e CARVALHO, 2003; MS, 2007; PESSÔA, 1961).

As lesões iniciais costumam ser nodulares, localizadas profundamente na hipoderme, ou pequenas pápulas, semelhantes à picada de inseto, que evoluem aumentando em tamanho e profundidade (lesões papulo-tuberosas) e ulcerando no vértice. As lesões vegetantes caracterizam-se pelo aspecto papilomatoso, úmido e de consistência mole, enquanto que, as verrucosas caracterizam-se por superfície seca, áspera, com presença de pequenas crostas e descamação, estes dois tipos de lesões podem ser primárias ou evoluírem para úlceras. As lesões cutâneas, ao evoluir para a cura, costumam deixar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa, áreas de hipo ou de hiperpigmentação e traves fibrosas. Algumas vezes tornam-se hipertróficas, ou ficam despercebidas, por sua coloração, tamanho, forma ou localização, podendo permanecer ativas por vários anos (COSTA *et al.*, 2009).

- **Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD):** É uma expressão clínica relativamente rara, podendo ser observada em até 2% dos casos de LT. Foi descrita em 1986 e desde então têm sido realizadas pesquisas que complementam as descrições clínicas com informação sobre suas características imunológicas e parasitológicas. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *L. (V.) braziliensis* e a *L.(L.) amazonensis*.(CARVALHO et al., 1994; COSTA *et al.*, 1986).

Essa forma caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco, o número de lesões é variável > 10 a centenas. A história natural da doença nestes pacientes inicia com uma ou várias lesões localizadas apresentando características clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. A adenomegalia satélite observada em mais da metade dos casos da forma localizada, raramente é detectada nos pacientes com a forma disseminada e quando se apresenta é de aspecto discreto. Posteriormente, ao desenvolvimento da(s) lesão (ões) primárias, acontece um fenômeno, mais ou menos agudo provavelmente por disseminação do parasito por via hemática ou linfática, que se estabelece em poucos dias, às vezes em 24 horas, causando lesões distantes do local da picada (COSTA *et al.*, 2009).

- **Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD):** No Brasil, esta forma clínica é causada pela *L.(L.) amazonensis*. Constitui uma forma rara, porém grave, que ocorre em pacientes anérgicos (não reativo), com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões do tegumento cutâneo do corpo. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) apresenta-se negativa. De um modo geral, na LCD não ocorre comprometimento das mucosas, ou às vezes ocorre de

modo discreto, havendo apenas infiltração da mucosa nasal por contigüidade. É muito raro encontrar relatos de destruição septal ou presença de pólipos nas mucosas labial e nasal (BRYCESON, 1969; CONVIT *et al.*, 1962; MORIEARTY *et al.*, 1978). Casos da forma “limítrofe” foram descritos, com presença de lesões mistas (úlceras e nódulos), que podem surgir espontaneamente ou ser induzidos por tratamento (MORIEARTY *et al.*, 1978; OKELO *et al.*, 1991; SILVEIRA *et al.*, 2004).

- **Leishmaniose Mucosa (LM):** Particularmente importante na América do Sul, onde a principal espécie causadora é a *L.(V.) braziliensis*, embora, já tenham sido isoladas outras espécies de parasitas (*L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) guyanensis*) (MARSDEN, 1986; MARSDEN, 1994; RIBEIRO e LOPES, 1994). Nos países andinos as leishmanias mais frequentemente isoladas são a *L.(V.) panamensis* e *L.(V.) guyanensis* (CUPOLILO *et al.*, 1994). Os poucos casos registrados no Velho Mundo, são descritos no Sudão, e estão relacionados a áreas endêmicas de doença visceral (durante ou após a leishmaniose visceral), causada pela *L.(L.) donovani* e diferentemente da forma ocasionada na América do Sul, nunca é precedida ou acompanhada por lesões cutâneas, respondendo ao tratamento quando utilizado antimonialis ( $Sb^{+5}$ ) (LESSA *et al.*, 2001). Ainda no velho mundo, há registros de casos LM causados por *L. (L.) infantum* (MS, 2007).

Apresenta-se com aspectos de cronicidade, latência e por desenvolver metástases em mucosas, conduzindo a quadros clínicos desfigurantes (MARSDEN, 1986; MARSDEN, 1994; RIBEIRO e LOPES, 1994). É de difícil diagnóstico parasitológico e a taxa de refratariedade ao tratamento com  $Sb^{+5}$  é significativa. Estudos em pacientes com LC, mostram que entre 2 a 5% dos casos curados após tratamento específico, desenvolveram forma mucosa da doença após vários anos da cura da lesão inicial (ALMEIDA *et al.*, 1995; MARSDEN, 1986; MARSDEN, 1994). Alguns estudos comprovam, a recorrência da doença com o fato de que a *Leishmania* tem capacidade de persistir por muito tempo e até por toda vida no

hospedeiro, mesmo após tratamento específico (AMATO *et al.*, 1998; SCHUBACH *et al.*, 2001).

No Brasil, a LTA é uma doença em fase de expansão geográfica, registrando, na década de 80, casos em 19 estados brasileiros e, a partir de 2003, todas as Unidades Federadas passaram a registrar casos autóctones. No período de 1996 a 2007 a LTA apresentou uma média anual de 28.233 casos novos e coeficientes de detecção variando entre 13,5 a 22,4 casos por 100.000 habitantes. As maiores proporções de casos são das regiões Norte e Nordeste, com 36,7% e 33,3%, respectivamente. Os coeficientes médios mais elevados foram registrados na região Norte (89,6/100.000 habitantes), seguidos das regiões Centro-Oeste (40,1/100.000 habitantes) e Nordeste (22,0/100.000 habitantes) (ALVES, 2008). Analisando a distribuição espacial dos dados de LTA do ano de 2006 e comparando-os com a média de ocorrência de casos no período de 2003 a 2005, verifica-se que 53,9% e 53,2% dos casos estão distribuídos nos estados da Amazônia Legal, respectivamente (ALVES, 2008).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies de leishmanias tegumentares, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* além das espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi*, que foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (SILVEIRA *et al.*, 2002; MS, 2000).

Infecções por leishmanias que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos. Algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais. Considerados hospedeiros acidentais da doença, animais domésticos apresentam numerosos registros de infecção. O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (LAINSON & SHAW, 1979).

O ciclo de transmissão da *L.(V.) guyanensis*, no Brasil, aparentemente está limitado à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), estendendo-se para Guianas. É encontrado principalmente em florestas de terra firme – áreas que não se alagam no período de chuvas. Dentre os possíveis reservatórios silvestres da *L. (V.) guyanensis*, a preguiça real (*Choloepus didactylus*) tem sido atribuído o papel principal na Amazônia brasileira (LAINSON, 1985) e em alguns locais da Guiana Francesa nas áreas de florestas primária (PAJOT *et al.*, 1982). Também implicado como importante reservatório silvestre está o *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), e secundariamente temos *Proechimys* (rato silvestre) e o *Didelphis marsupialis* (gambá) (BARRETT e SENRA, 1989; LAINSON, 1985; ARIAS *et al.*, 1981). Os parasitos podem ser encontrados na pele aparentemente “sadia” e nas vísceras desses animais (LAINSON e SHAW, 1998; LAINSON *et al.*, 1981, FRANCO, 1990), embora o papel desempenhado por estes animais ainda não tenha sido bem definido, as evidências encontradas indicam serem reservatórios desta espécie de *Leishmania*.

No Estado do Amazonas a leishmaniose cutânea é a de maior predomínio, principalmente no município de Manaus (NAIFF *et al.*, 1999; BARRET *et al.*, 1989). Sua transmissão na região de Manaus é atribuída principalmente pelas espécies *L. umbratilis* e *L. anduzei*, consideradas, respectivamente, vetores principal e secundário da *L. (V.) guyanensis*, parasito de maior incidência da leishmaniose cutânea na região (ARIAS e FREITAS, 1977). A espécie *L. umbratilis* apresenta alta densidade tanto na copa das árvores, onde predomina o ciclo silvestre, como no solo, sobre o tronco das árvores de grande porte, onde é encontrado em estado de repouso nas primeiras horas da manhã, picando o ser humano quando este adentra no ambiente silvestre (BRASIL, 2007).

## 2.2 Diagnóstico e Tratamento

Clinicamente, a LTA apresenta-se de maneira variada, desde as formas inaparentes ou com ulcerações de pele, que podem ser discretas ou extensas e com evolução espontânea para cura após alguns meses, até aquelas com ulcerações múltiplas ou disseminadas. A forma clínica mais freqüente da doença é a leishmaniose cutânea localizada, que se caracteriza por lesões ulceradas, de bordos elevados e circulantes, com pouca secreção e indolores, localizadas na parte exposta do corpo onde os flebótomos inoculam as promastigotas. Estas podem ou não regredir espontaneamente (COSTA *et al.*, 1990; CONVIT *et al.*, 1993; PEARSON & SOUZA, 1995). A forma disseminada é caracterizada por úlceras típicas associadas a inúmeras lesões papulares ou acneiformes, decorrentes de disseminação hematogênica, podendo, por contigüidade comprometer a mucosa (COSTA *et al.*, 1986; CARVALHO *et al.*, 1994). A leishmaniose difusa, síndrome relativamente incomum, tem como lesão inicial uma pápula localizada e desta se dissemina por todo o tegumento, com lesões nodulares não ulceradas e deformantes, onde se observa extraordinária riqueza parasitária, com tendência à cronicidade (CONVIT *et al.*, 1972; LLANOS CUENTAS *et al.*, 1984; PEARSON & SOUZA, 1995).

O diagnóstico parasitológico da leishmaniose cutânea é feito: pela busca dos parasitos nas lesões, que são visualizados ao microscópio após coloração pelo método de Giemsa; pelo isolamento do parasito em meio de cultivo (WALTON *et al.*, 1977; HENDRICKS *et al.*, 1978; JAFFE *et al.*, 1984) ou infecção em animais de laboratório como o hamster (*Mesocricetus auratus*) e posterior isolamento do parasito a partir das lesões nesses animais. Testes imunológicos, como a reação intradérmica de Montenegro e a pesquisa de anticorpos para *Leishmania*, também auxiliam no diagnóstico. Outros testes baseados na detecção do DNA parasitário na biópsia de lesão e o exame histopatológico são métodos auxiliares no

diagnóstico da doença (FERREIRA & ÁVILA, 2001). No entanto, vários destes métodos genéricos são considerados porque não identificam especificamente o agente etiológico e demandam tempo e profissionais treinados para a visualização e pesquisa do parasito. Em alguns casos, dependendo da espécie em questão e do organismo infectado, a sorologia pode apresentar reações cruzadas com outras espécies de tripanosomatídeos ou a reação intradérmica (IDRM) pode apresentar resultado negativo (COSTA *et al.*, 2009). Portanto, é necessária a busca de métodos mais confiáveis, específicos e rápidos para o diagnóstico da leishmaniose, como é o caso da reação em cadeia da polimerase (COURA *et al.*, 1996).

No passado, foram utilizados vários tipos de tratamentos para a leishmaniose, tendo sido testado o quinino, a injeção de aguarrás (essência de terebintina), os arsenicais e a atebriina, todos com resultados diversos, mas nenhum deles realmente efetivo (REES *et al.*, 1985). O grande achado foi o advento do uso dos antimoniais. No início do século XX, o médico Gaspar Vianna utilizou pela primeira vez o tártaro emético (tartarato duplo de potássio e antimônio) para tratar com sucesso um caso de leishmaniose mucocutânea e até hoje, os antimoniais vêm sendo utilizados como as drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose (VIANNA, 1912). Os antimoniais pentavalentes ainda são as drogas mais recomendadas pela sua comprovada eficácia e algumas vantagens, como a rápida eliminação renal e a limitada acumulação nos tecidos (BERMAN, 1988; KOFF & ROSEN, 1994; BERMAN, 1997).

Medicamentos como o estibogliconato de sódio (Pentostam ®), antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime ®) (Figura 2) são ativos na maioria dos casos, apesar dos problemas renais e cardíacos que acarretam, além do seu alto custo (AKENDENGUE *et al.*, 1999). Existe ainda um limitado conhecimento a respeito do mecanismo de ação destes compostos e somente um estudo mais detalhado com relação à estrutura destes antimoniais pentavalentes começou a surgir. Outras drogas alternativas como a Pentamidina (Pentacarinat

®) e anfotericina-B (Fungizone ®, Ambisome ®) (Figura 3) desenvolvidas inicialmente para a cura de outras doenças, embora bastante tóxicas também são usadas contra as diferentes formas de leishmaniose (CANTO-CAVALHEIRO, 1999; AKENDENGUE *et al.*, 1999).

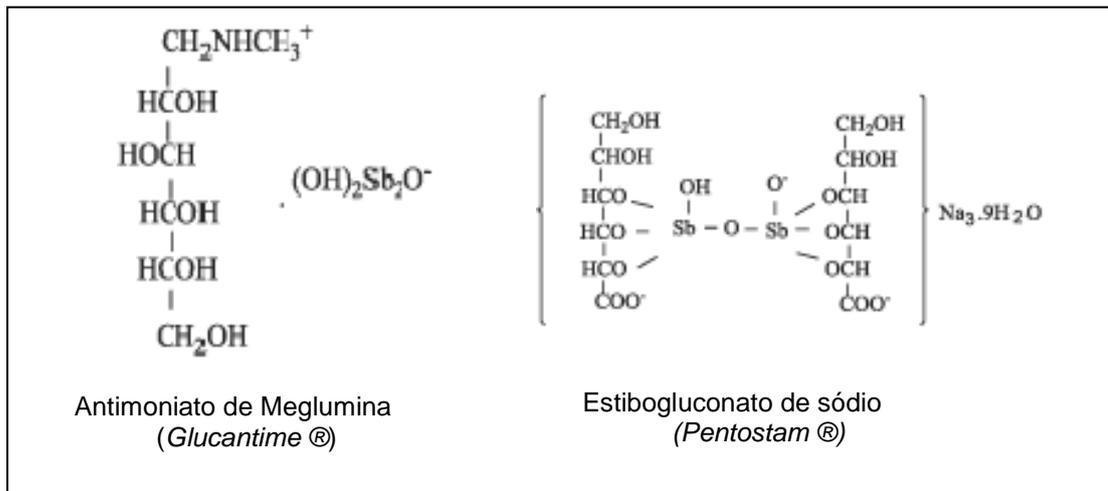


Figura 2. Drogas de primeira escolha utilizadas no tratamento da leishmaniose.

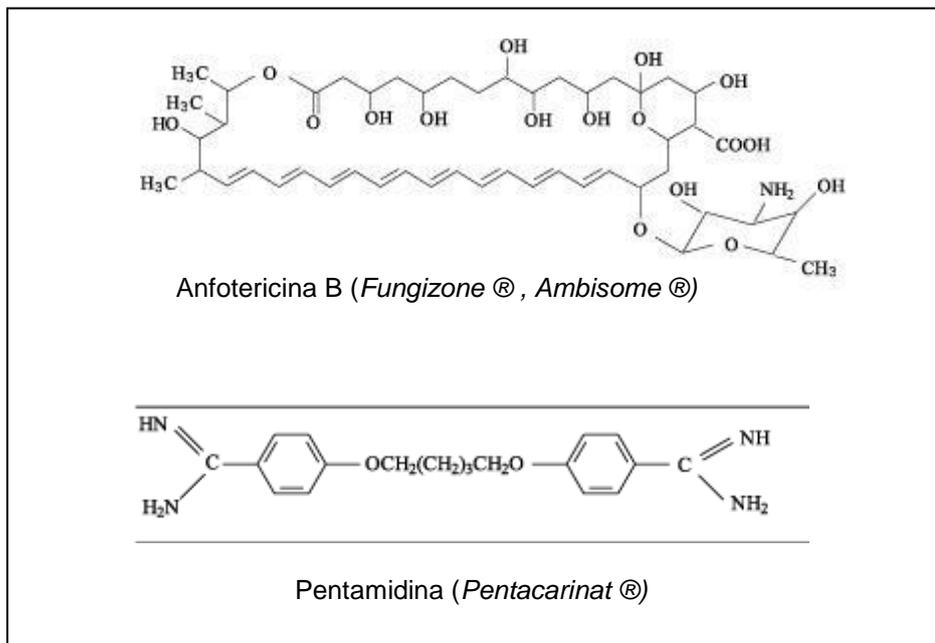


Figura 3. Drogas de segunda escolha utilizadas no tratamento da leishmaniose.

Contudo, apresentam vários inconvenientes, tais como: a via de aplicação que é intramuscular ou endovenosa, a resistência terapêutica (falta de eficácia) na forma mucosa e seus efeitos colaterais. Além disso, são drogas que precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que as vezes requer hospitalização, acarretando desconforto para o doente e alto custo para a União. Os antimoniais vêm também mostrando uma taxa crescente de ineficácia ao longo dos anos (ERCOLI, 1966; BELAZZOUG & NEAL, 1985; WHO, TDR News, 1990; BERMAN, 1997), em parte devido ao surgimento de algumas cepas resistentes à droga (OLLIARO & BRYCESON, 1993). Essas drogas apresentam ainda efeitos colaterais sérios, que se traduzem em: toxicidade cardíaca, alterações de intervalo no segmento ST (Espaço que compreende o fim e o início de ondas no exame eletrocardiograma) no eletrocardiograma, arritmias (MAINZER & KRAUSE, 1940; BERMAN, 1988; HEPBURN *et al.*, 1994), trombocitopenia (HEPBURN, 1993), alterações de enzimas hepáticas, artralguas, mialgias, náuseas e vômitos (BERMAN, 1988; TRACY & WEBSTER, 1996). São ainda relatados casos de pancreatite (GASSER *et al.*, 1994) e até mesmo morte súbita em pacientes que receberam altas doses do medicamento (PEARSON & SOUZA, 1995). Além disso, há indícios de que essas drogas podem induzir mutagênese (LÉONARD & GERBER, 1996).

No Brasil, o tratamento alternativo tem sido feito com drogas de segunda escolha, os antimoniais pentavalentes: as Pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) ou anfotericina B. No entanto, ambos também apresentam a inconveniência da via de administração, intramuscular ou endovenosa, além de uma toxicidade intolerável nas doses terapêuticas eficazes e, ainda o alto custo. No tratamento com pentamidina podem aparecer efeitos tóxicos como hipotensão, astenia, dispnéia, dor de cabeça, sudorese e sensação de formigamento, vômitos e dores epigástricas. Além disso, podem surgir lesões hepáticas, pancreáticas, renais e do sistema nervoso (SANDS *et al.*, 1985).

A demanda por novos fármacos leishmanicidas tem se intensificado com o aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes, bem como a fármacos de segunda geração. Outrossim, o número de quimioterápicos disponíveis, principalmente para tratamento de doenças crônicas, está muito abaixo do satisfatório (VOULDOUKIS *et al.*, 2006).

A medicina tradicional é baseada nas necessidades do indivíduo. Diferentes pessoas devem receber diferentes tratamentos, mesmo que, de acordo com a medicina oficial, elas sofrem da mesma doença. Acredita-se que cada indivíduo tem sua própria constituição e circunstâncias sociais que resultam em diferentes reações às causas de doenças e ao tratamento (DAMAS, 2005; OMS, 2002). Sendo assim, a medicina tradicional pode ser codificada, regulamentada, ensinada e praticada ampla e sistematicamente, assim como pode ser reservada, mística e extremamente localizada, com difusão oral de conhecimentos e práticas (OMS, 2002).

No ano de 2002, a OMS criou um guia intitulado Estratégia para as Medicinas Tradicionais 2002-2005, no qual orienta a utilização de todos os recursos locais apropriados e disponíveis nos cuidados primários de saúde. (DAMAS, 2005; AKERELE, 2006). Incentiva ainda os governantes de todo o mundo a utilizarem a Medicina tradicional em seus programas de saúde, com isso diminuindo os custos e utilizando métodos e técnicas sociais aceitáveis (CARRICONDE, 2002).

Sabendo-se disso, na maior parte do mundo, a leishmaniose é endêmica em áreas onde os sistemas tradicionais de medicina são praticados. Pela falta de acesso a sistemas alopáticos de tratamento, em muitos casos, a terapia tradicional consiste na administração oral de extratos de plantas para a forma sistêmica da doença e ainda, como preparações tópicas para a forma cutânea (NETTO *et al.*, 1985).

### 2.3. Atividade Leishmanicida Encontrada nas Plantas

Atualmente, com a falta de vacina ou drogas eficientes para o tratamento da leishmaniose, faz da doença um dos maiores problemas de saúde pública. Métodos alternativos estão sendo pesquisados para solucionar este problema e as plantas medicinais apresentam-se como uma opção viável, visto que são encontradas na natureza em abundância e produzem centenas de metabólitos que podem ser isolados e testados contra essa e outras doenças.

Alguns compostos naturais têm sido investigados e muitos deles têm mostrado significativa atividade antileishmania. Esses compostos pertencem a diferentes classes de substâncias tais como: alcalóides, terpenos, quinonas, lactonas, cumarinas, chalconas, tetralonas, lignanas e saponinas (AKENDENGUE *et al.*, 1999).

Alcalóides isoquinolínicos que são ativos contra espécies de *Leishmania* têm sido isolados de plantas pertencentes às famílias Annonaceae tem-se destacado pelo amplo número de substâncias isoladas e identificadas que apresentam atividade antileishmania. Alguns compostos como anonaina e liriodenina isoladas da casca do caule de *Annona spinescens* têm mostrado atividade *in vitro* contra formas promastigotas de espécie de *Leishmania* na concentração de 10 µg/mL (37 µM) e 25 µg/mL (90 µM) respectivamente (QUEIROZ *et al.*, 1996).

Xylopina e nomuciferina isoladas das folhas de *Guatteria amplifolia* exibiram pronunciada atividade contra *L.(L.) mexicana* na concentração de 0,88 µg/mL (3 µM) e 3,93 µg/mL (14 µM) e contra *L. (V.) panamensis* na concentração de 1,77 µg/mL (6 µM) e 7,87 µg/mL (28 µM) respectivamente, enquanto que os alcalóides cryptodorina e nornantenina isoladas das folhas de *G. dumetorum* exibiram pronunciada atividade contra *L.(L.) mexicana*

na concentração de 1,85 µg/mL (6 µM) e 4,87 µg/mL (15 µM) respectivamente (MONTENEGRO *et al.*, 2003).

Isoquattouregidina isolada das cascas do caule de *G. foliosa* é ativa contra *L. (L.) donavani* e *L.(L.) amazonensis* na concentração de 100 µg/mL. (MAHIOU *et al.*, 1994).

Argentilactona isolada das espécies *A.haematantha* exibiu forte atividade *in vitro* contra vários tipos de *Leishmania* na concentração de 10 µg/mL (51 µM). *In vivo*, administrado por via subcutânea na concentração de 25 mg/kg/dia por 14 dias, o composto produziu efeito semelhante ao animoniato de N-metilglucamine (Glucantime®), diminuindo as grandes lesões em ratos infectados com *L.(L.) amazonensis* (WAECHTER *et al.*, 1997).

#### **2.4 O vegetal *Caesalpinia ferrea* Martius**

*Caesalpinia ferrea* Martius é uma leguminosa que pertence a ordem Fabales da família Caesalpinaceae, e que cresce em todo o Brasil (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002), sendo largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (ALZUGARAY, 1984). Esta família apresenta entre 150 a 180 gêneros e mais de 2.200 espécies tropicais e subtropicais (CRONQUIST, 1981).

**Classificação Taxonômica da *Caesalpinia ferrea* Martius segundo CRONQUIST (1981):**

➤ *Caesalpinia ferrea* Martius

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sub-Classe: Magnoliidae

Ordem: Fabace

Família: Caesalpinioideae

Gênero: *Caesalpinia*

Espécie: *Caesalpinia ferrea* Mart.

Em Pernambuco cresce, predominantemente, nas áreas pobres da Região do Vale do São Francisco e nos municípios de Floresta e de Buíque. É conhecida vulgarmente como pau-ferro, jucá, pau-ferro-verdadeiro, jucaína, ibirá-obi, imirá-itá, miureitá, pau de jucá, miurá, obi, muirá e itá (DI STASI, 1989; BRAGANÇA, 1996, LORENZI, 2002). Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, do tipo legume (vagem), com sementes escuras; folhas compostas; altura de 10-15 m, com tronco curto de 40-60 cm de diâmetro, que fornece madeira para construção civil e lenha (figura 4). A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitadas para plantios em áreas degradadas (PIO CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002). O pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (NASCIMENTO *et al.*, 2002).





Figura 4. Imagens de *Caesalpinia ferrea* Martius (folhas, flores, árvore, fruto íntegro e tronco, respectivamente). Fonte: [www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br).

#### **2.4.1 Aspectos Etnofarmacológicos e Farmacológicos de *Caesalpinia ferrea* Martius**

A *C. ferrea* é empregada na medicina tradicional como: anti-micótico, anti-anêmico, anti-hemorragico, anti-diarréico, cicatrizante, nas afecções pulmonares, sedativo, adstringente, anti-diabético, utilização em tosse, asma, tuberculose, coqueluche, contusões, cicatrização de feridas, tratamento de úlcera, golpes, afecções da boca e garganta, entre outros (BRAGANÇA, 1996; BORRÁS *et al.*, 2003). Popularmente, as partes utilizadas no tratamento de diversas infecções como a Leishmaniose, são as folhas, cascas, sementes, raízes, pedaços de madeira e favas (DI STASI, 1989; BORRÁS *et al.*, 2003).

Estudos com extratos brutos dos frutos e caules de *C. ferrea* revelaram a presença de atividade antiúlcera (BACCHI *et al.*, 1995) e de restrição ao fluxo coronariano por possível ação sobre a musculatura lisa dos vasos, com alterações eletrocardiográficas secundárias (PINTO, 2000). De *C. ferrea* foram ainda caracterizadas as atividades cardiotônica,

antimicrobiano, analgésico e antiinflamatório (CARVALHO *et al.*, 1996), antihistaminico e antialérgico, anticoagulante e hepatotóxico (DI STASI *et al.*, 2002a).

A avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato aquoso do fruto de *C. ferrea*, coletado na região de Icoaraci, Belém, Pará (Brasil), demonstrou que a utilização do extrato numa concentração de 300 mg/Kg, via oral, provocou uma redução significativa do edema em consequência de injeção de carragenina, induzido em ratos do tipo Wistar (CARVALHO, 1996). Os frutos dessa espécie também passaram por estudos para comprovar sua atividade anti-tumoral, que foi evidenciada *in vitro* com uso do vírus Epstein-Barr, sendo que o ácido gálico e metil galato, presentes nos frutos da espécie, foram identificados como responsáveis por essa atividade (NAKAMURA, 2002a). Outro estudo realizado com o fruto de *C. ferrea* mostrou uma atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos graças a componentes inibidores não-competitivos da aldolase redutase (UEDA *et al.*, 2001).

Um trímero de chalcona, denominado de Pauferrol A, encontrado no extrato obtido do caule de *C. ferrea*, mostrou uma potente atividade inibidora contra a topoisomerase II humana, e uma ação inibidora da proliferação celular por indução de apoptoses nas células HL60 leucêmicas mielóides agudas, similar ao efeito das drogas anti-cancer contra topoisomerase tipo II (HIROSHI *et al.*, 2007).

O extrato aquoso da casca do caule de *C. ferrea* induziu hipotensão arterial associada a taquicardia em ratos normoativos; provocando, no entanto, bradiarritmias transientes. Em dose de 40 mg/Kg, o mesmo extrato causou vasodilatação na artéria mesentérica de ratos, o qual parece ser remediável por canais abertos de ATP-sensitivo K<sup>+</sup>. As pesquisas mostram que esta planta parece ter um potencial clínico para uso em doenças cardio-vasculares, entretanto, maiores estudos são necessários para garantir a seguridade e margem terapêutica para o uso humano (MENEZES *et al.*, 2007).

Um estudo de mutagenicidade foi feito em ratos do tipo Wistar, nos quais foi administrado intraperitonealmente o extrato aquoso do fruto de *C. ferrea*, coletado na região de Icoaraci, Belém, Pará (Brasil), nas concentrações de 500, 1000 e 1500 mg/kg e ciclofosfamida 30 mg/Kg como controle positivo. Após 24h da administração, células da medula óssea dos ratos foram coletadas e nenhuma alteração significativa foi observada, quanto a aberrações cromossômicas ou mutações, durante a mitose nos ratos em estudo, quando comparados com o grupo controle tratados apenas com água (SOUZA *et al.*, 2006).

CORTEZ (2004), mostrou que o extrato metanólico de vagens de *C. ferrea* na concentração de 10 mg/mL/24h apresentou atividade leishmanicida *in vitro* para formas extracelulares de *L. (V.) guyanensis* e fungicida para *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.

#### **2.4.2 Aspectos Fitoquímicos de *C. ferrea***

Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico das cascas do caule e das folhas mostrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos em *C. ferrea* (GONZALEZ *et al.*, 2004).

Dentre os constituintes químicos descritos na literatura destaca-se a presença de polifenóis, onde o ácido gálico e o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte da atividade biológica dos frutos desta espécie de leguminosa (UEDA *et al.*, 2001). Segundo UEDA *et al.* (2001), foram isolados dos frutos secos de *C. ferrea*, ácido elágico e 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico. Destacou-se também a identificação, em seu caule, de uma chalcona trímica com anel de ciclobutona, chamada de Pauferrol A, com excelente atividade inibidora da enzima DNA topoisomerase II.

Estudando os efeitos de compostos isolados de frutos de *C. ferrea* como preventivo contra o câncer, NAKAMURA *et al.* (2002a) identificaram o ácido gálico e metil galato como principais constituintes químicos na espécie vegetal e, possíveis responsáveis pela atividade biológica. No mesmo estudo, além desses compostos, foram isoladas outras 49 substâncias, sendo a maioria derivada do ácido gálico e de acetofenonas (NAKAMURA *et al.*, 2002b).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Avaliar a atividade *in vitro* de extratos brutos de *Caesalpinia ferrea* Martius contra formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, obtendo frações semi-purificadas do extrato de melhor atividade biológica com posterior análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

#### 3.2 Específicos:

- Obter os extratos hexânicos e metanólicos dos frutos, epicarpós e sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart.;
- Obter frações semi-purificadas do extrato bruto de maior atividade leishmanicida;
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos extratos de *C. ferrea* Mart., contra formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*;
- Determinar o perfil cromatográfico dos extratos brutos de *C. ferrea*;
- Obter informações sobre as possíveis classes de substâncias presentes no extrato bruto com maior atividade leishmanicida pela análise em Ressonância Magnética Nuclear.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, primário, experimental com delineamento do tipo relação estímulo/efeito visando avaliar a atividade *in vitro* de extratos/frações de *C. ferrea* para a espécie *L. (V.) guyanensis*, através de ensaios biológicos. O estudo foi realizado em diversas etapas, sendo que as extrações e fracionamentos foram realizados no Laboratório de Bioprospecção da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN) e os bioensaios no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas da Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde (CPCS) ambos no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

### 4.2 Universo de Estudo

#### 4.2.1 Material Vegetal

Os frutos de *Caesalpinia ferrea* (figura 5) foram coletados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) Campus V8 em 8 de março de 2009, por Luis Augusto Gomes de Souza, este localizado na cidade de Manaus, estado do Amazonas (03° 05' 48,0" S e 59° 59' 55,0" W. Gr.), em altitude de 197 pés ou cerca de 65,7 m acima do nível do mar. Foram preparadas exsicatas botânicas para correta identificação do táxon e depositada no Herbário do INPA, com registro sob o número 228.022 e autenticada por Angélica Cortês.



Figura 5. Imagens da árvore e do tronco com identificação de *C. ferrea* na qual foram coletados os frutos íntegros. Fonte: Nívea Maria Simões Falcão.

#### 4.2.2 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão

Os materiais vegetais que tiveram o perfil químico analisado e avaliado quanto a atividade leishmanicida contra *L.(V.) guyanensis*, foram os frutos que apresentasse um bom estado de conservação. Os frutos afetados por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não eram de interesse para o estudo foram excluídos.

### **4.3 Procedimentos**

Na figura 6, é apresentado um fluxograma dos procedimentos realizados neste estudo.

#### **4.3.1 Obtenção dos Extratos Brutos**

Após a coleta, o material vegetal constituído por frutos, foi selecionado manualmente, sendo uma porção separada de suas partes morfológicas (epicarpos e sementes) para tratamento individual. Os materiais vegetais (frutos ínteiros, epicarpos e sementes) foram secos, sendo submetidos à secagem em estufa de ar circulante, a temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2-3 dias. Após a secagem, cada material foi moído em moinho de facas e armazenado em recipientes, individualmente.

Os extratos brutos foram preparados conforme protocolo descrito por CORTEZ (2004). Cada amostra em pó foi colocada em recipiente de vidro, adicionado hexano, colocado em ultra-som por 20 minutos e filtrado posteriormente. Este processo de extração, foi repetido 3 vezes ou tantas quantas foram requeridas para o material ser extraído visualmente pelo solvente. Após a extração com hexano, o material vegetal foi seco e submetido à extração com metanol. Seguiu-se o mesmo procedimento realizado para obtenção do extrato bruto hexânico.

Os extratos hexânicos e metanólicos obtidos das diferentes partes vegetais foram concentrados em rota-evaporador sob pressão reduzida, à temperatura de  $48\text{ }^{\circ}\text{C}$  para maior liberação de cada solvente utilizado. Essas amostras rota-evaporadas foram acondicionadas em frascos de vidro totalmente esterilizados e armazenadas sob refrigeração.

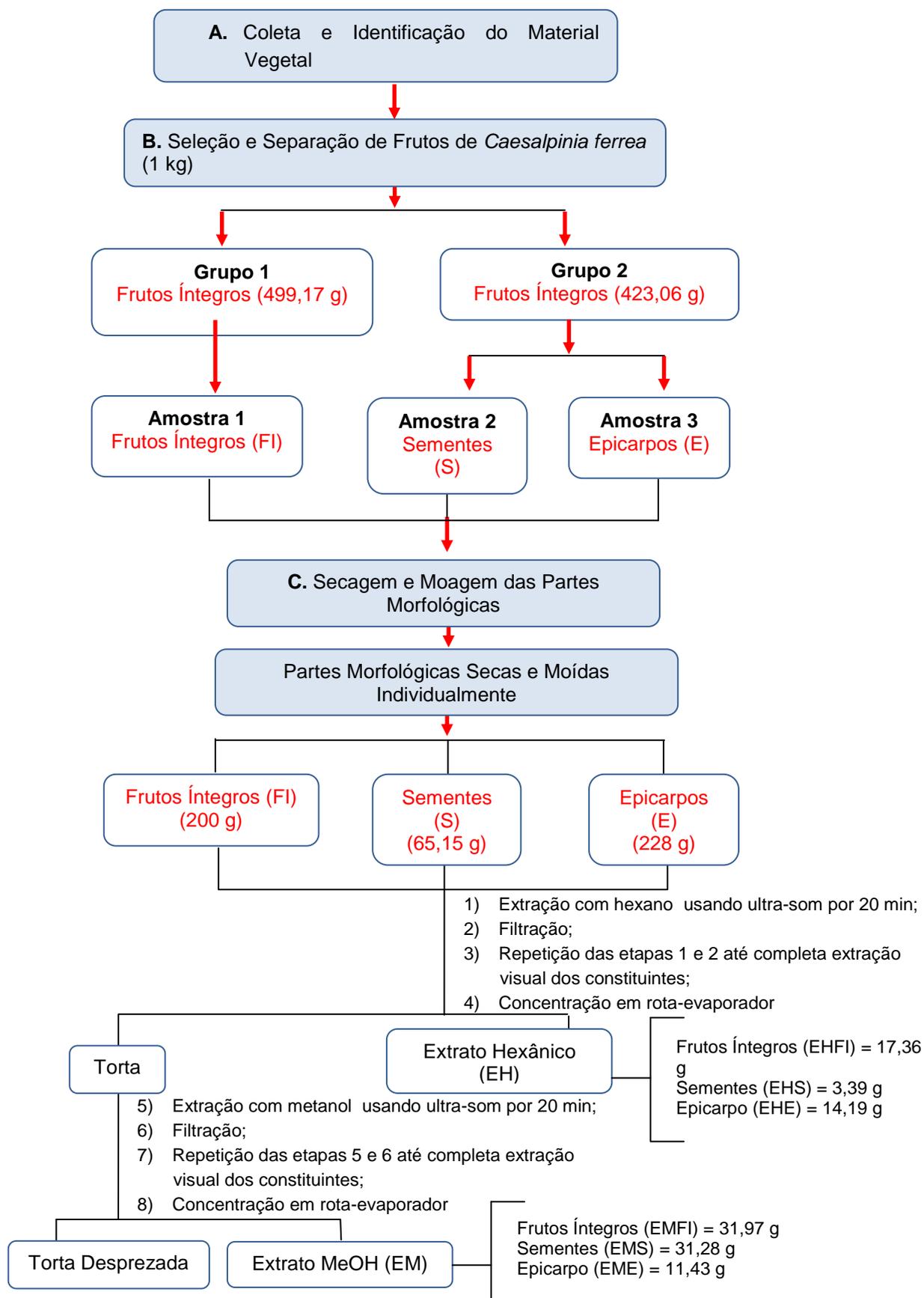


Figura 6. Procedimento de extração do material vegetal e obtenção dos extratos brutos.

#### 4.3.2 Cultivo Parasitário e Preparação do Inóculo

Foi feita a avaliação da atividade *in vitro* dos extratos de *C. ferrea* utilizando-se a espécie *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/IM4147) cedida pelo Lab. de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde (CPCS/INPA). Os parasitos foram mantidos inicialmente a 25°C em meio bifásico NNN (NOVY; MACNEAL, 1904; NICOLLE, 1908). Em seguida, estes foram adaptados ao meio líquido RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) acrescido de 100 µg/mL de gentamicina (Ariston) para a obtenção da curva de crescimento e preparo das massas parasitárias para a realização dos bioensaios.

Para a determinação das fases de crescimento dos parasitos nas condições estabelecidas de cultivo foi realizada uma curva de crescimento, em meio líquido RPMI 1640 (Gibco) completo. Para os ensaios foram utilizadas formas promastigotas de cultivo axênico na fase final logarítmica, aonde se encontram as formas consideradas como mais infectante. Massas de concentrados parasitários foram preparadas utilizando-se o meio líquido RPMI completo, totalizando cerca de 300 mL de volume final. Formas promastigotas dos flagelados foram coletadas, quantificadas através do uso de câmara de Neubauer (hematocitômetro) e ajustados no próprio meio de cultivo. A identificação da espécie de *Leishmania* utilizada neste estudo foi previamente confirmada antes e após a realização dos bioensaios, pela análise bioquímica de eletroforese de isoenzimas (FIGUEIRA, 2008).

Para a contagem dos flagelados, foi centrifugado o volume de 50 mL de inóculo de parasitas, à 4000 rpm durante 15 minutos à 4 °C. Em seguida, foi ressuspensão o sedimento num volume de 1 mL de meio líquido RPMI, no qual foi feita uma diluição seriada de 1:10, 1:100 e 1:1000 e posteriormente, a contagem dos mesmos em Câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para a concentração final de  $4 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$  em meio RPMI completo

para a realização dos testes *in vitro* (figura 7).

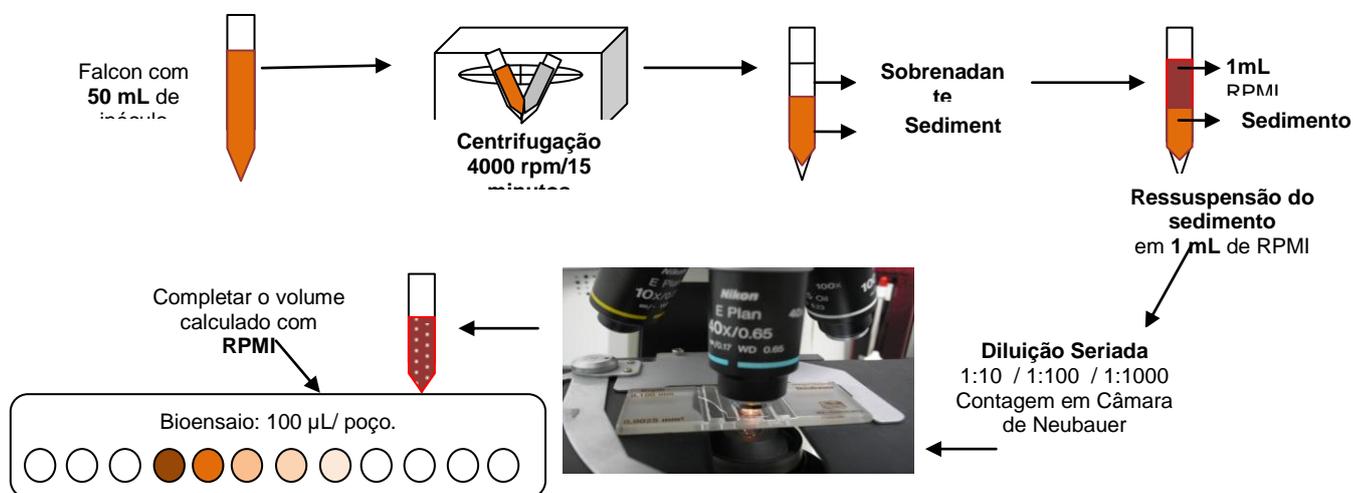


Figura 7. Preparação do inóculo de formas promastigotas para a realização de testes biológicos com *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

#### 4.3.3 Preparação dos Extratos Brutos para os Testes Biológicos *in vitro*.

Para o preparo da solução-estoque de cada amostra, foram pesadas as massas de extratos em balança analítica e dissolvidas em Dimetil-sulfóxido (DMSO/ Vetec) em uma proporção 1:1, individualmente. Dessas soluções foram retiradas alíquotas para obtenção de “extratos teste” na concentração de 20 mg/mL, tanto para os extratos hexânicos como para os metanólicos.

Em uma capela de fluxo laminar, fez-se a diluição da solução-mãe de cada extrato bruto obtido em meio de cultivo RPMI completo de modo que a concentração final de DMSO fosse inferior a 4% e que na concentração do extrato ficasse 20 mg/mL.

Em seguida, cada amostra dissolvida foi filtrada com auxílio de seringa estéril de 20 mL em filtro 0,22 µm Millipore® para tubos de ensaio de 50 mL tipo Falcon, acondicionando-os à 15 °C, obtendo-se assim a amostra filtrada para as análises *in vitro* -

bioensaios (figura 8).

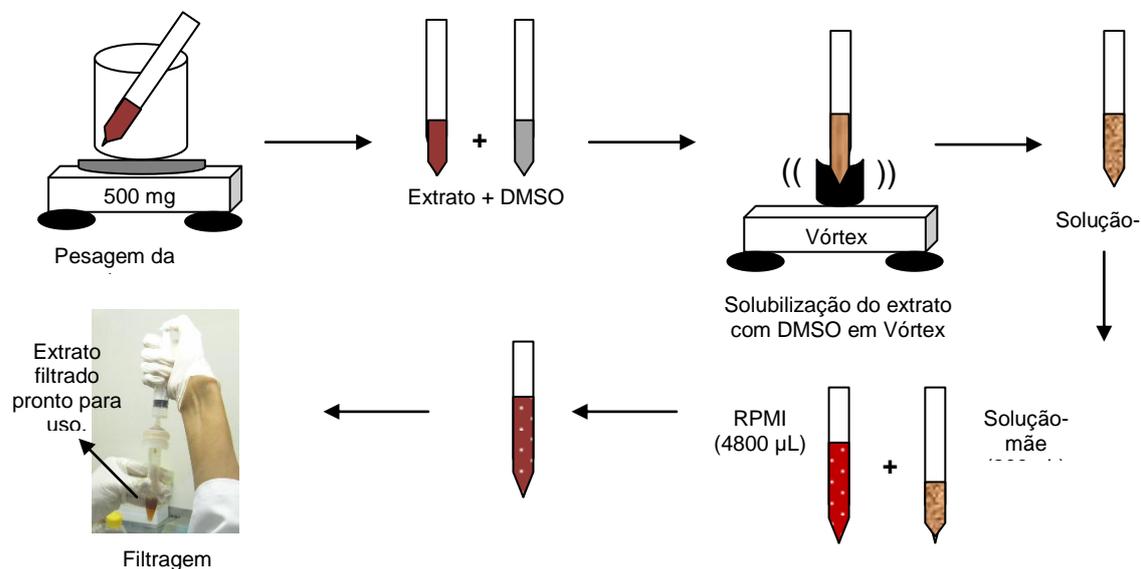


Figura 8. Procedimento esquemático do preparo dos extratos brutos e frações para ensaios de atividade biológica.

#### 4.4 Bioensaio: Avaliação da Atividade *in vitro*

A avaliação da atividade de *C. ferrea*, foi realizada *in vitro* através da adição das amostras em meio líquido RPMI completo, adequado ao desenvolvimento das leishmanias, sendo feito o acompanhamento 24, 48, 72 e 96 horas após o inóculo, através da quantificação das promastigotas por contagem das formas vivas e mortas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante vital azul de Trypan (Vetec), para discriminar a viabilidade dos flagelados (PHILLIPS, 1973).

Em um ensaio piloto, foi estabelecida a concentração máxima (até 4%) permitida para uso do solvente DMSO nos testes biológicos de forma que o mesmo não ocasionasse a

inibição do crescimento ou lise das leishmanias *in vitro*.

Os bioensaios foram realizados em microplacas de polietileno (Costar) de 96 poços (figura 9), distribuídos em 8 fileiras horizontais (A-H) e 12 colunas verticais. Para a realização dos bioensaios foram adicionados os reagentes aos poços das microplacas, com o auxílio de micropipeta multicanal, na seguinte ordem de adição e procedimentos:

- A. Meio de cultivo completo = 200  $\mu\text{L}$  nos poços da coluna 1 e 100  $\mu\text{L}$  nos poços das colunas 2 a 11, nas fileiras de A a H;
- B. “Amostras testes” = 100  $\mu\text{L}$  nos poços das colunas 2 e 3, nas fileiras de A a H;
- C. Diluições sucessiva das “amostras testes” = Após homogeneização do conteúdo dos poços das colunas 3, fileiras de A a H, foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  para os poços laterais da direita e sucessivamente repetidas até os poços da coluna 09, fileiras de A a H. Os 100  $\mu\text{L}$  retirados dos poços da coluna 09, fileiras de A a H foram desprezados;
- D. Solução de isotionato de pentamidina (Neo – Química) (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de meio de cultivo) = 100  $\mu\text{L}$  nos poços da coluna 12, das fileiras de A a H; = controle positivo do ensaio.
- E. Inóculo de *Leishmania* = 100  $\mu\text{L}$  nos poços das colunas 3 a 12, nas fileiras de A a H.

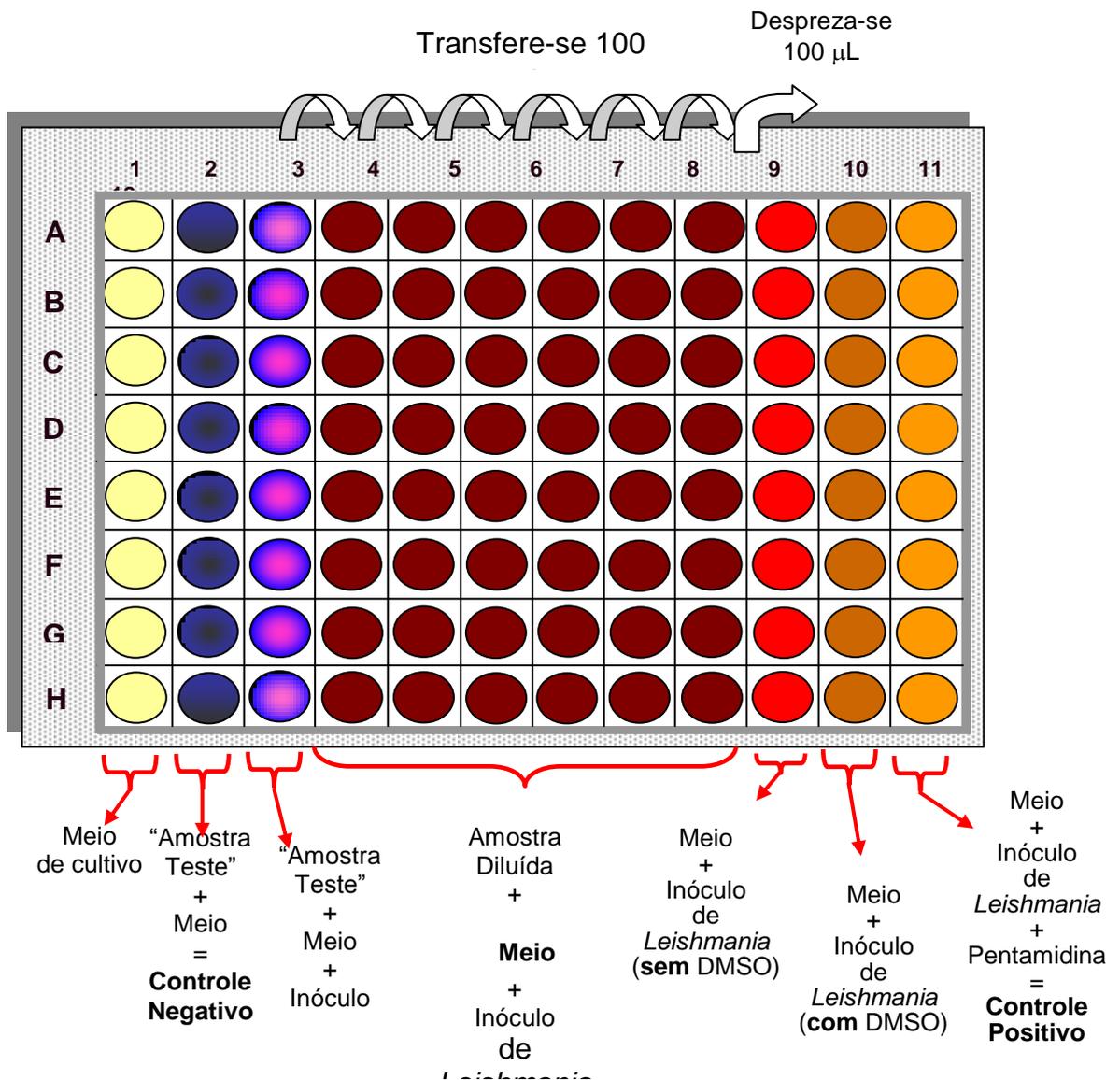


Figura 9. Ensaios biológicos para avaliação da atividade *in vitro* de extratos de *Caesalpinia ferrea* para *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Foram utilizados como controles dos ensaios: a) controle negativo: (no.01) fileira da coluna da microplaca contendo meio de cultivo; (no.02) meio de cultivo acrescido de extrato da matéria vegetal; (no. 10) meio de cultivo acrescido de formas promastigotas sem DMSO; (no. 11) fileira contendo meio de cultivo com formas promastigotas acrescido de DMSO na concentração inicial do ensaio. b) controle positivo: (no. 12) meio de cultivo com promastigotas de *Leishmania* spp. acrescido da droga de referência com ação leishmanicida

(Isotionato de Pentamidina).

#### **4.5 Critérios Quantitativos de Avaliação dos Experimentos com *Leishmania (Viannia) guyanensis***

##### 4.5.1 Estabelecimento do Percentual de Sobrevivência

O percentual de sobrevivência foi estabelecido pelo cálculo segundo adaptação de metodologia utilizada por BERMAN *et al.* (1982), sendo expressas ao final do experimento.

Para obtenção desses percentuais foram obtidas as médias de crescimento dos:

- Ensaio controles: Houve a divisão entre a média do número de promastigotas ao final do experimento dos grupos controles (poços sem presença de extrato) pela média do número de promastigotas encontradas no início do experimento (dia zero) e então, multiplicados por 100 (Promastigotas Controle = PSc.).

- Ensaio experimentais: A média do número de promastigotas ao final do experimento das culturas (poços) expostas aos extratos foram divididos pela média do número de promastigotas encontrada no final do experimento das culturas controles e então multiplicados por 100 (Promastigotas experimentais = PSe.).

##### 4.5.2 Cálculo da “Tendência” de Sensibilidade

O valor de tendência (somente obtido quando PSe for diferente de zero) de sensibilidade aos extratos e ou frações foi obtido através da razão entre o percentual de sobrevivência dos grupos controles e o percentual de sobrevivência das culturas expostas aos respectivos extratos (TS= PSc./PSe.).

#### 4.5.3 Cálculo da DL<sub>50</sub> (Dose Letal Média)

Este resultado foi obtido, calculando num gráfico as concentrações dos extratos e ou frações (valores de X) e percentual de sobrevivência (valores de Y). A DL<sub>50</sub> corresponde ao ponto de inserção no eixo X quando traçada uma reta correspondente a 50% do valor de Y.

### 4.6 Avaliação do Perfil Cromatográfico

Os extratos brutos foram analisados através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinação do perfil cromatográfico.

#### 4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Foram testados diversos sistemas cromatográficos, utilizando solventes de diferentes polaridades e cromatofolhas de gel de sílica GF<sub>254</sub>. Amostras dos extratos hexânicos e metanólicos obtidos foram dissolvidos em solventes orgânicos apropriados (Hexano e Metanol, respectivamente) e, por meio de tubo capilar, aplicadas às cromatofolhas em pontos a 1,5 cm acima da base inferior, 2,0 cm das laterais e 1,0 cm entre eles. As cromatofolhas foram então colocadas em cubas cromatográficas, previamente saturadas com o eluente, e eluídas à temperatura ambiente (25 °C).

- a. Os eluentes utilizados para desenvolverem os cromatogramas dos extratos hexânicos (Semente: Fruto: Epicarpo) foram Hexano (Hex) e Acetato de Etila (AcOEt) em proporção 7:3. Após a eluição das amostras, as placas foram retiradas das cubas, secas, visualizadas (Luz Visível, Luz UV-254 nm, Luz UV-365 nm) e

borrifadas com reveladores cromatográficos (Anisaldeído, Sulfato Sérico e Dragendorff)

b. Os eluentes utilizados para desenvolverem os cromatogramas dos extratos metanólicos foram:

- **(Epicarpo, Fruto e Semente):** Eluídos com Diclorometano (DCM) e Metanol (MeOH) em proporção 3:7 e visualizados em Luz Visível, Luz UV-254 nm, Luz UV-365 nm e borrifadas com o revelador cromatográfico Difenilpicrilhidrazila (DPPH).

- **(Fruto, Epicarpo e Semente):** Eluídos com Diclorometano (DCM) e Metanol (MeOH) em proporção 1:1 e visualizados em Luz Visível, Luz UV-254 nm, Luz UV-365 nm e borrifadas com o revelador cromatográfico Cloreto férrico (COLLINS, 1997).

Como substâncias de referência foram utilizadas padrões de ácidos fenólicos, flavonóides, terpenos, alcalóides. Como critérios de seleção dos sistemas cromatográficos foram considerados os valores de Rf relativos às substâncias de referência e resolução das manchas.

#### 4.6.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram registrados em espectrômetro Eft -60 NMR Spectrometer (60 MHz), utilizando como solventes Clorofórmio Deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e

metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ) e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

#### 4.7 Fracionamento do Extrato Metanólico dos Epicarpós de *Caesalpinia ferrea*

O extrato bruto que apresentou melhor atividade biológica foi o metanólico dos epicarpós de *C. ferrea*. Para iniciar o fracionamento, o mesmo foi dissolvido e transferido para funil de separação, usando-se como solvente uma mistura Água ( $\text{H}_2\text{O}$ ): Metanol ( $\text{MeOH}$ ) (95:5), sendo submetido separadamente á fracionamento por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (figura 10) – Diclorometano; Acetato de Etila; Butanol e Água (COLLINS, 1997).

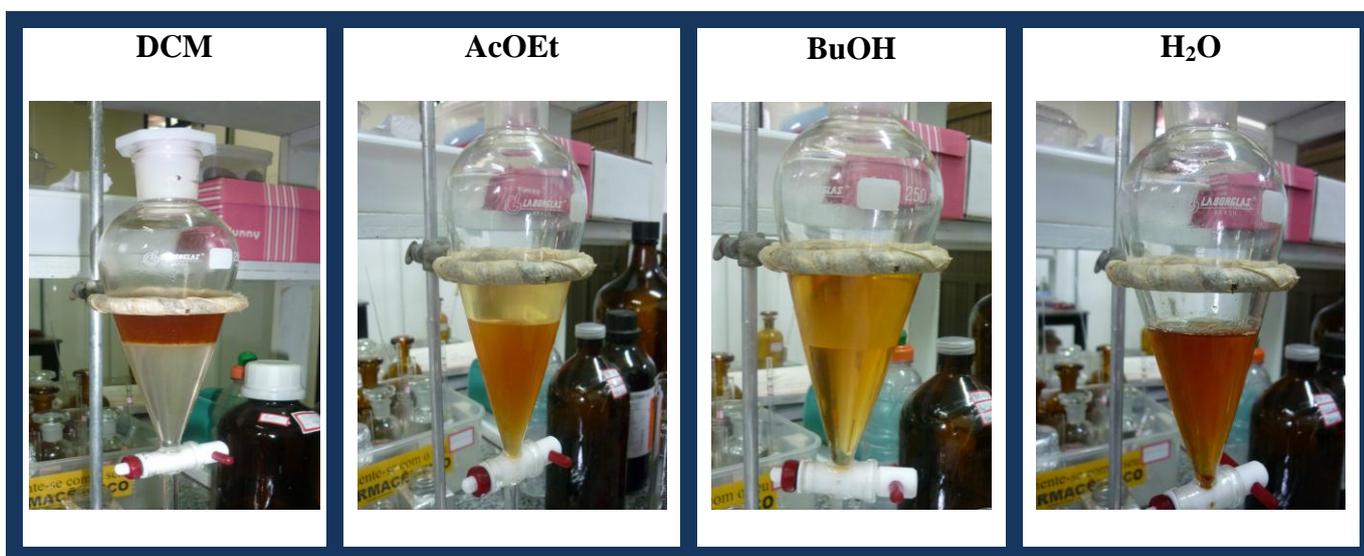


Figura 10. Partição com solventes de polaridades crescentes.

#### 4.8 Análise Estatística dos Resultados

Os dados foram registrados e lançados em um banco de dados, utilizando técnicas estatísticas inferenciais e descritivas no tratamento das variáveis quantitativas e qualitativas.

Para análise estatística dos resultados, foi utilizado o teste “t” de Student. Em todos os resultados foram aplicados os seguintes testes: regressão linear, análise de variância (ANOVA), teste da hipótese sobre o coeficiente da correlação (THCC) e diferença mínima significativa (DMS). O pacote estatístico utilizado para análise dos dados foi o programa desenvolvido por DEAN *et al.* (1997) e adotado pela OMS, EPI INFO 2007.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fármacos rotineiramente utilizados para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar pertencem à classe dos antimoniais pentavalentes, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), os quais foram desenvolvidos há mais de 60 anos. Ambos apresentam toxicidade e casos de falha do tratamento são comuns, tanto por resistência de determinadas cepas do parasito, quanto por baixa atividade em pacientes imunodeprimidos ou descontinuidade do tratamento por parte do paciente devido aos efeitos colaterais (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Em casos de resistência do parasito, a Anfotericina B é uma outra opção de tratamento, sendo, entretanto, mais tóxica que o Pentostam® e o Glucantime®. A fim de reduzir a toxicidade, novas formulações de Anfotericina B têm sido desenvolvidas, como a forma lipossomada (AmBisome®), a forma lipídeo complexada (Abelcet®) e uma Anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil™). Entretanto, estas possuem custos elevados e por este motivo têm sido utilizadas primariamente apenas para tratamento da leishmaniose visceral. Devido toda a problemática da LTA ser menor do que a visceral ou de outras enfermidades, poucos esforços têm sido despendidos para avaliar o uso destas formulações em seu tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Na última década, medicamentos alternativos e novas formulações de fármacos tradicionais têm sido disponibilizados e já estão em uso em alguns países (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Outros ainda estão na fase dos testes clínicos, como miltefosina, paramomicina em nova formulação, imiquimod e anti-fúngicos azólicos, como cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Entretanto, é pouco provável que estes estudos levem ao desenvolvimento de um único fármaco capaz de tratar todas as variantes das leishmanioses, com suas diferentes espécies causadoras e diferentes graus de resistência aos

tratamentos tradicionais (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Apesar das posologias e das respostas ao tratamento serem variáveis de acordo com a espécie do parasito, região endêmica e fatores do hospedeiro, geralmente os mesmos fármacos e posologias continuam sendo utilizados para tratar as leishmanioses independentemente da espécie causadora (REITHINGER *et al.*, 2007).

A OMS, frente à necessidade imperiosa de novos fármacos para o tratamento das doenças parasitárias, vem incentivando o estudo de compostos que possam abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes (WHO, 1990), principalmente pelos vários estudos que vem sendo realizados baseados no conhecimento tradicional das diversas comunidades brasileiras e o uso de plantas no tratamento de diversas infecções.

Várias utilizações medicinais da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart. são encontradas na região amazônica. As folhas desta espécie, na forma de decocto, são utilizadas externamente e no local, contra hemorróides, enquanto que o uso interno desta decocção é útil contra amebíase e problemas hepáticos, além de ser usado como fortificante para crianças. O sumo das folhas é usado internamente para problemas cardíacos. A infusão conjunta das folhas e frutos é útil para tratar inflamações do fígado e tuberculose, enquanto que a decocção da casca é usada internamente como anti-disentérico (SANGUINETTI, 1989). Outros usos medicinais desta espécie são referidos por vários autores tais como o uso das raízes como febrífugas e anti-diarreicas; do fruto com propriedades anti-diabéticas; da casca como desobstruente e da madeira como anti-catarral e contra feridas. No Piauí a espécie também é utilizada contra feridas e contusões em Alagoas contra tosse crônica, asma e como cicatrizante (PIO CORRÊA, 1975). Estudos com extratos brutos dos frutos e caules de *C. ferrea* revelaram a presença de atividade antiúlcera (BACCHI *et al.*, 1995) e de restrição ao fluxo coronariano por possível ação sobre a musculatura lisa dos vasos, com alterações eletrocardiográficas

secundárias (PINTO, 2000). Ainda foram caracterizadas dessa espécie as atividades cardiotônica, antimicrobiano, analgésico e antiinflamatório (CARVALHO *et al.*, 1996), antihistamínico e antialérgico, anticoagulante e hepatotóxico (DI STASI *et al.*, 2002a). Sendo assim, extratos metanólicos e hexânicos de *C. ferrea* foram avaliados quanto a sua atividade contra formas promastigotas axênicas de *L. (V.) guyanensis*, tendo sido também detectada a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos em *C. ferrea* (GONZALEZ *et al.*, 2004).

Dentre os constituintes químicos descritos na literatura destaca-se a presença de polifenóis, onde o ácido gálico e o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte da atividade biológica dos frutos desta espécie de leguminosa (UEDA *et al.*, 2001). Segundo UEDA *et al.* (2001), foram isolados dos frutos secos de *C. ferrea*, ácido elágico e 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico. Destacou-se também a identificação, em seu caule, de uma chalcona trímica com anel de ciclobutona, chamada de Pauferrol A, com excelente atividade inibidora da enzima DNA topoisomerase II. Os triterpenos isolados de *C. ferrea* são os mais comuns encontrados em plantas superiores. Dentre as atividades biológicas atribuídas aos triterpenos isolados, pode-se citar a atividade antiinflamatória do lupeol, da  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (GEETHA; VARALASHMI, 2001).

Descreve-se e discute-se a seguir os resultados obtidos neste estudo que teve como alvo avaliar a atividade do jucá para o tripanosomatídeo *L. (V.) guyanensis*.

### 5.1 Rendimentos na Obtenção dos Extratos Brutos de *C. ferrea*

Da espécie botânica coletada, foram obtidos os seguintes pesos frescos e rendimentos na extração dos extratos brutos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1

Rendimentos dos Extratos Brutos de *Caesalpinia ferrea*

Espécie Botânica	Partes Estudadas	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)	Extrato Bruto (g)	Rendimento (%)
<i>Caesalpinia ferrea</i>	Fruto	499,17	200,0	Hex. 17,36	8,7 %
				MeOH 31,970	16,0 %
	Semente	65,15	63,14	Hex. 3,392	5,4 %
				MeOH 31,284	49,5 %
	Epicarpo	357,91	228,0	Hex. 14,198	6,2 %
				MeOH 11,432	5,0 %

Os extratos metanólicos apresentaram um maior percentual de rendimento em relação aos extratos hexânicos e o material que melhor apresentou um percentual de rendimento da espécie, foi o da semente.

A diferença que existe entre substâncias polares e apolares utilizadas na extração das substâncias, está na força intermolecular que atua nelas. O hexano, por ser apolar, apresenta uma fraca atração entre suas moléculas, facilitando o movimento dessas apresentando ponto de fusão e ebulição extremamente baixo. Enquanto que o metanol, por ser polar, apresenta regiões com diferentes densidades eletrônicas, nas quais sofrem uma força de atração mais

intensa, dificultando o movimento dessas moléculas e impedindo-as de atingir o estado gasoso com tanta facilidade (BARBOSA, 2004).

A estrutura histológica das diversas partes componentes de uma planta é bastante heterogênea. Existem órgãos, como as sementes, cujos tecidos apresentam uma textura rígida, com reservas alimentares acumuladas no albúmen – constituído por substâncias nutritivas, é a parte da semente responsável pela alimentação da planta nas primeiras fases de desenvolvimento - podendo este ser amiláceo (rico em amido), oleaginoso (rico em lipídio) ou córneo (quando se apresenta rígido) (DI STASI *et al.*, 1989).

Diferentemente do solvente apolar hexano, o metanol têm o poder de extrair das sementes mais facilmente heterosídeos, em geral, misturas de compostos de alta polaridade e hidrófilos - que sofrem aglutinação à molécula de água (MATOS, 1988). Ao contrário dos epicarpos, que apresentam uma estrutura com tecidos compactados e ricos em fibras, é possível entender que houve um maior rendimento do extrato metanólico da semente por elas apresentarem em suas estruturas, além de substâncias nutritivas, várias outras que estão presentes, como serão descritas mais adiante na bioprospecção química.

## **5.2 Ensaio biológico *in vitro* dos extratos brutos contra *Leishmania (Viannia) guyanensis* - avaliação da atividade anti-promastigotas**

### **5.2.1 Curva de Crescimento de *L.(V.) guyanensis***

Os parasitos cultivados em meio RPMI completo e mantidos a 25 °C, após um inóculo inicial de 10<sup>6</sup> promastigotas/mL, apresentaram crescimento parasitário, alcançando a fase logarítmica com pico máximo às 72 horas (figura 11). Foi observado um considerável

crescimento no número de formas promastigotas sendo obtida a massa parasitária para os ensaios, 48 horas após inoculação inicial no meio de cultivo.

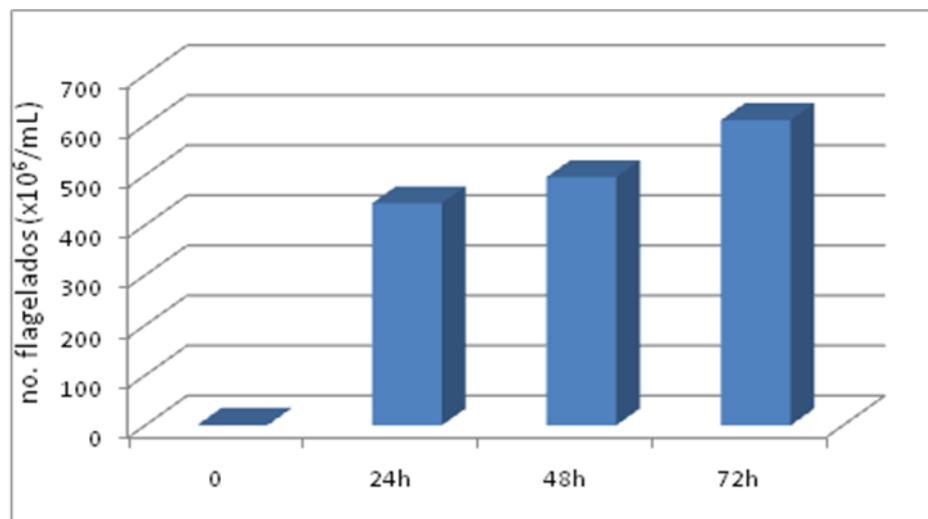


Figura 11. Curva de crescimento de *Leishmania (Viannia) guyanensis* em cultivo axênico meio RPMI 1640 completo no período de até 72 horas.

Através da curva de crescimento é possível determinar a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento de microorganismos em cada sistema de cultivo. Para *Leishmania* spp., a determinação desta fase é importante uma vez que autores sugerem uma associação entre a fase de crescimento da cultura e o sucesso na obtenção e manutenção de amastigotas axênicos (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998).

No presente estudo, a fase exponencial tardia e a fase estacionária foram determinadas observando-se a curva de crescimento e a morfologia dos promastigotas de *L. (V.) guyanensis*. Para *L. (V.) guyanensis*, a fase exponencial tardia e a fase estacionária ocorreram, respectivamente, no 4º e 5º dia de cultivo (dados não mostrados). As diferenças que geralmente são observadas nas curvas de crescimento de flagelados do gênero *Leishmania*, sob as mesmas condições de cultivo, ressaltam diferenças no tempo de replicação celular das duas espécies. Durante o cultivo *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania*, dois tipos principais ocorrem na cultura: os promastigotas procíclicos e os promastigotas metacíclicos. Os promastigotas procíclicos são formas mais alongadas, não infectivas para o hospedeiro

mamífero e que replicam ativamente, sendo predominantes na fase exponencial de crescimento *in vitro*. *In vivo*, procíclicos são encontrados no intestino médio do vetor flebotomíneo, onde se multiplicam e se diferenciam para as formas infectivas metacíclicas. Os promastigotas metacíclicos são definidos como formas pequenas, delgadas, com flagelo relativamente longo e que ocorrem em grande número em uma população de fase estacionária *in vitro*. *In vivo*, metacíclicos são encontrados no intestino anterior do flebotomíneo e são infectivos para o hospedeiro mamífero (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998).

#### 5.2.2 Padronização dos Ensaios Biológicos com *L. (V.) guyanensis*

Neste procedimento, em ensaio piloto, verificou-se que o meio de cultivo RPMI completo foi adequado a realização dos testes, confirmando-se também que a concentração máxima permitida do solubilizante dos compostos DMSO (dimetilsulfonida) acrescido no meio, sem que houvesse interferência no crescimento dos parasitos, fosse inferior a 4 %.

#### 5.2.3 Ensaio Biológico com *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Após a padronização do ensaio, em duplicata, foram avaliadas em meio de cultivo RPMI completo a atividade dos extratos brutos metanólicos dos frutos, epicarpos e sementes e do extrato hexânico das sementes de *C. ferrea* como também da pentamidina, droga usada como referência em todos os experimentos. Estes foram avaliados em formas promastigotas axênicas de *L. (V.) guyanensis*, realizada após 24, 48 e 72 horas de incubação dos parasitos, os quais foram contados em câmara de Neubauer e comparados com DMSO, sem a droga, e somente com os parasitos. A viabilidade das formas promastigotas testadas, foi avaliada utilizando-se corante vital azul de tripan, discriminando-se assim as formas vivas das mortas.

#### 5.2.4 Avaliação da Atividade do Extrato Metanólico dos Frutos Íntegros de *C. ferrea*

A figura 12 exibe a atividade leishmanicida do extrato metanólico dos frutos íntegros de *C. ferrea* o qual apresentou forte atividade na concentração de 20 mg/mL, aonde o fruto demonstrou inibição de 24 à 72 horas ao crescimento dos parasitos contra *L. (V.) guyanensis*. Visivelmente, apresentou pronunciada atividade anti-*Leishmania* até a concentração de 2,5 mg/mL, mostrando uma resposta satisfatória contra as formas promastigotas, havendo um decréscimo na sobrevivência dos mesmos.

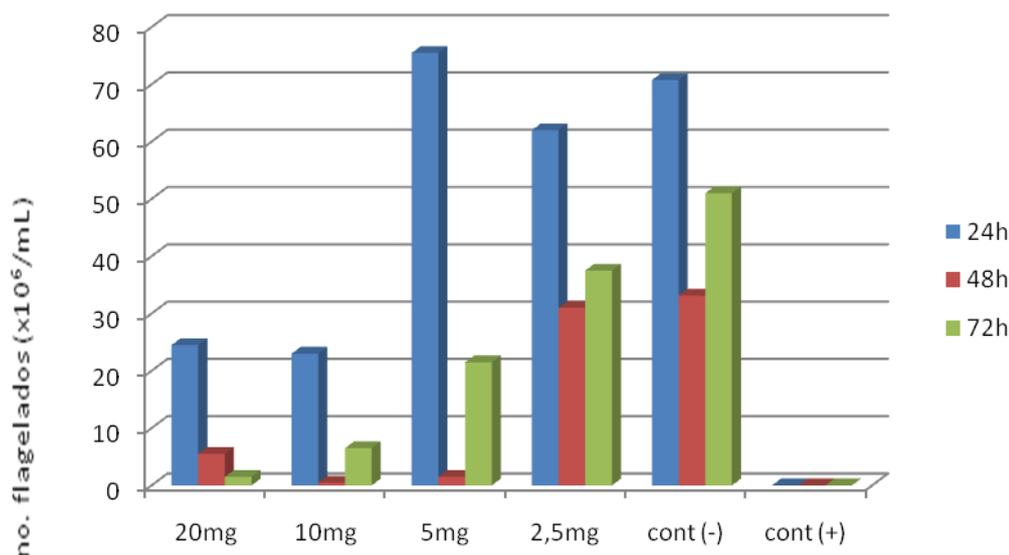


Figura 12. Avaliação da atividade do extrato metanólico de frutos íntegros de *C. ferrea* contra formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* – contagem de formas promastigotas viáveis (24, 48 e 72 horas).

O extrato bruto de *C. ferrea*, de acordo com a literatura tem demonstrado inúmeras atividades biológicas, incluindo atividades leishmanicidas, fungicidas, além de antiinflamatórias e analgésicas. Segundo CORTEZ (2006), o extrato metanólico dos frutos de *C. ferrea*, apresentou atividade leishmanicida contra *L.(L.) amazonensis* e maior atividade contra *L.(V.) guyanensis*. A atividade leishmanicida do extrato bruto dos frutos tem sido

pouco estudada, apesar do potencial biológico desse extrato contra, particularmente, parasitos causadores da leishmaniose.

Dentre os constituintes químicos descritos na literatura destaca-se a presença de polifenóis, onde o ácido gálico e o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte da atividade biológica dos frutos desta espécie de leguminosa (UEDA *et al.*, 2001), porém não se pode afirmar se estes compostos são os componentes ativos principais responsáveis pela atividade leishmanicida. Acredita-se que a atividade leishmanicida esteja relacionada diretamente com a presença de diferentes compostos na mistura de diferentes partes morfológicas do fruto (sementes e epicarpos).

De acordo com BOYOM *et al.* (2003) cada componente presente na mistura complexa contribui de certa forma para determinada atividade biológica e não um composto individualmente, o qual foi observado no estudo de diferentes extratos brutos com atividade anti-*Leishmania*.

#### 5.2.5 Avaliação da Atividade do Extrato Metanólico dos Epicarpos de *C. ferrea*

A figura 13 exibe a atividade leishmanicida do extrato metanólico dos epicarpos de *C. ferrea* contra *L. (V.) guyanensis*. Conforme observado na figura, o extrato metanólico dos epicarpos na concentração de 20 mg/mL, demonstrou atividade biológica contra as formas promastigotas do parasito, inibindo o crescimento dos parasitos em 24 horas, havendo um visível crescimento no número de flagelados em 48 horas e em 72 horas, uma nova inibição contra *L. (V.) guyanensis*.

Mesmo apresentando inconstância quanto a sua atividade leishmanicida, o extrato mostrou-se ativo em 24 e 72 horas contra as formas promastigotas da *L. (V.) guyanensis*, exibindo pronunciada atividade ativadora do crescimento parasitário em 48 horas. Sabendo-se disso, em busca de agentes promissores contra a leishmania, observamos que o extrato metanólico dos epicarpos, por apresentarem inconstância em sua atividade, não mostrou-se conveniente, tal como, a atividade do extrato metanólico dos frutos íntegros de *C. ferrea*.

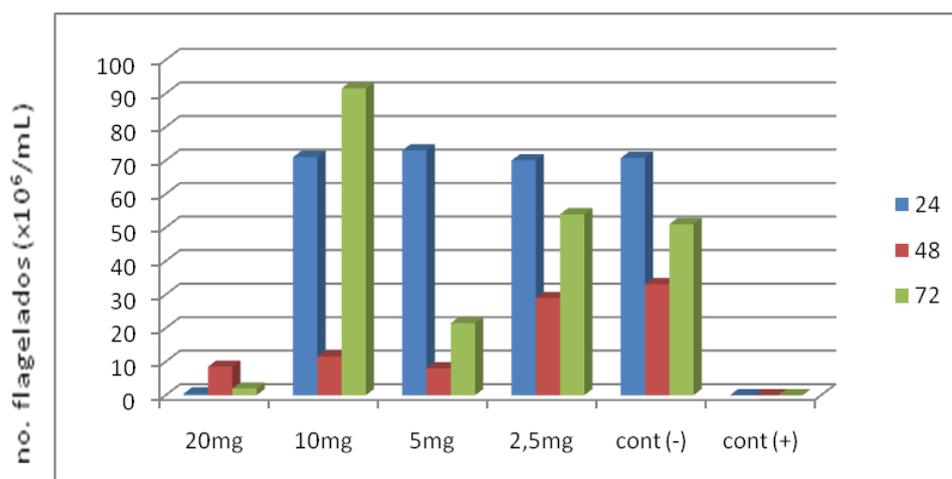


Figura 13. Atividade do extrato metanólico dos epicarpos de *C. ferrea* contra *L. (V.) guyanensis* – contagem de formas promastigotas viáveis.

### 5.2.6 Avaliação da Atividade do Extrato Metanólico e Hexânico das Sementes de *C. ferrea*

O extrato metanólico e hexânico da semente não apresentou inibição parasitária mostrando-se em todas as concentrações testadas, não efetivas em relação à sua ação leishmanicida, favorecendo o crescimento das formas promastigotas de *L.(V.) guyanensis* (figura 14 e 15).

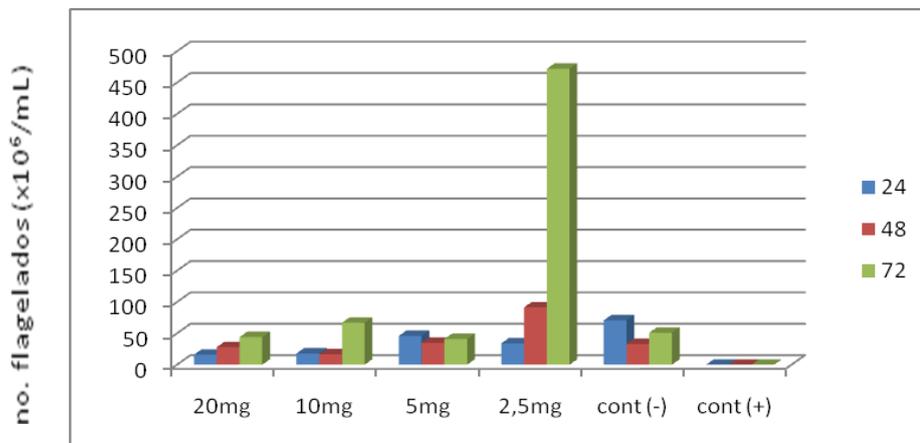


Figura 14. Atividade do extrato metanólico das sementes de *C. ferrea* contra *L. (V.) guyanensis* – contagem de formas promastigotas viáveis.

Como foi dito anteriormente, extratos metanólicos são normalmente constituídos por heterosídeos em geral, que são substâncias com alta polaridade e hidrófilos (MATOS, 1988), enquanto que extratos hexânicos extraem da planta, mais facilmente, misturas de compostos de baixa polaridade e compostos polares, porém pouco hidrófilos. Tratando-se da extração de sementes, podemos observar que a ação desta mistura de compostos, apresentou atividade nas diferentes concentrações testadas por possivelmente apresentarem em suas estruturas, além de substâncias nutritivas ideais para o crescimento parasitário, várias outras presentes, verificando-se a sua não atividade inibitória contra os flagelados.

Entre os principais componentes do meio de cultura RPMI, utilizado para o cultivo das formas promastigotas testadas, estão as fontes de carbono e energia como os açúcares, as

fontes de nitrogênio, fósforo e sais minerais (ALEXANDER *et al.*, 1989). O extrato metanólico e hexânico da semente demonstrou conter substâncias viáveis para o crescimento parasitário, podendo estes extratos serem até utilizados como possíveis fontes de nutrição em meio de cultivo para *L.(V.) guyanensis*.

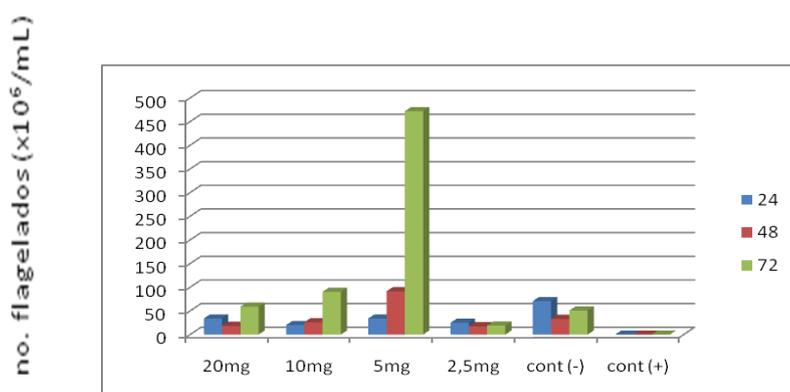


Figura 15. Atividade do extrato hexânico das sementes de *C. ferrea* contra *L. (V.) guyanensis* – contagem de formas promastigotas viáveis.

Comparando-se os extratos hexânico e metanólico das sementes, observamos a visível diferença de atividade entre um e outro. Sabendo-se que extratos hexânicos apresentam substâncias apolares em sua constituição, nota-se que os parasitos apresentam afinidade no contato com essas substâncias, estimulando o crescimento dos mesmos em meio de cultivo, enquanto que substâncias polares constituem os extratos metanólicos das sementes, mostrando o efeito inibitório no contato dos parasitos com o extrato (figura 16).

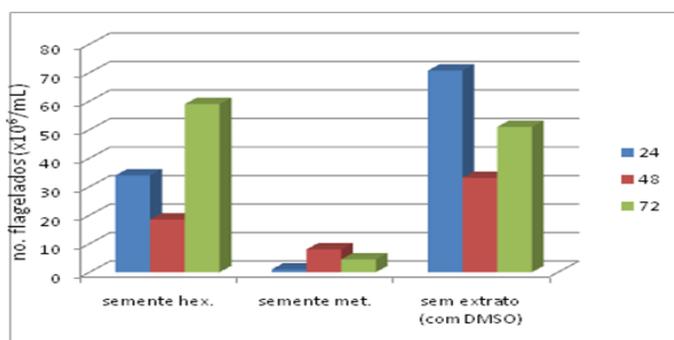


Figura 16. Atividade do extrato metanólico e hexânico de sementes de *C. ferrea* contra *Leishmania (Viannia) guyanensis* numa concentração de 20mg/mL.

Comparando os extratos metanólicos testados na concentração de 20 mg/mL de *C. ferrea*, o que melhor apresentou atividade leishmanicida decrescente no fator sobrevivência em 24, 48 e 72 horas, foi o extrato metanólico do fruto íntegro (Figura 17)

Observando os dados do extrato metanólico do epicarpo, notou-se uma ótima atividade somente nas primeiras 24 horas, mostrando-se efetiva contra *L.(V.) guyanensis* e mantendo-se inconstante em 48 e 72 horas de ação. Assim sendo, sua ação durante o tempo de análise não foi efetiva tanto quanto o extrato metanólico do fruto.

O extrato metanólico da semente, mostrou-se com atividade ativadora em relação ao crescimento no número de formas promastigotas de *L.(V.) guyanensis*, por apresentar possivelmente substâncias nutritivas consideradas fontes de energia para o crescimento do parasito.

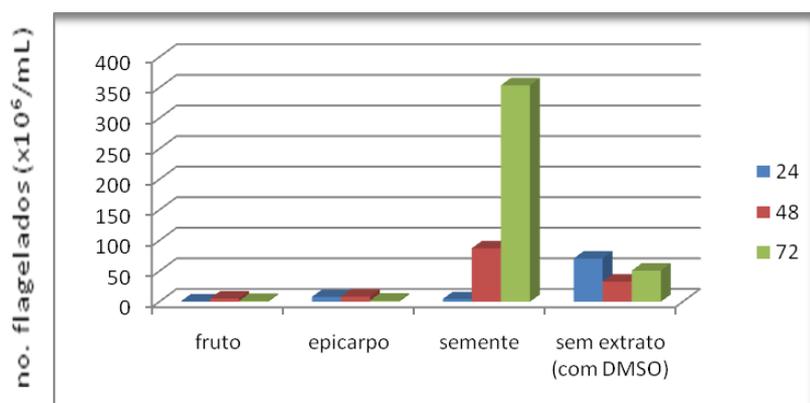


Figura 17. Atividade do extrato metanólico de diferentes partes de *C. ferrea* contra *L.(V.) guyanensis* numa concentração de 20mg/mL.

Atualmente diversos estudos relacionados à quimioterapia anti-leishmania tem sido realizados, porém não se definiu um composto com alta atividade e baixa toxicidade. A dificuldade do estabelecimento de novos agentes quimioterápicos vem direcionando a pesquisa para a identificação e caracterização bioquímica e molecular de alvos específicos e únicos ao parasito (CROFT, 1999). Nos últimos anos diversas pesquisas vêm tendo como enfoque principal e estudo de substâncias químicas e fármacos com ação biológica já

conhecida e/ou utilizados para outras doenças, como é o caso da pentamidina, uma diamidina aromática usada inicialmente no final da década de 50 para o tratamento de pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinni* (BASSELIN *et al.*, 1996). Atualmente a atividade leishmanicida de extratos de plantas têm sido bastante estudadas, na busca de medicamentos que sejam menos tóxicos e prejudiciais a saúde dos pacientes.

A DL50 obtida neste ensaio para o extrato metanólico do fruto foi de 20 mg/mL/24 h. Da mesma forma verifica-se um elevado percentual de inibição do crescimento das formas promastigotas na concentração de 20 mg/mL/24 h e 72 h do extrato metanólico de epicarpo quando comparado com as outras concentrações (Figura 18 e 19). No entanto, concentrações mais baixas já foram encontradas utilizando-se outras plantas, como o observado por Costa (2004) que encontrou uma  $DL_{50} \leq 10,0 \mu\text{g/mL}$  nos extratos de *Annona foetida* com atividade leishmanicida.

Considerando os extratos que apresentaram resultados mais promissores nas condições analisadas, temos: extrato metanólico do fruto íntegro, apresentando  $DL_{50}/24\text{h} = 53,3$  e extrato metanólico do epicarpo, apresentando  $DL_{50}/24\text{h} = 50,1$  para *L.(V.) guyanensis*, como demonstrados nas figuras abaixo.

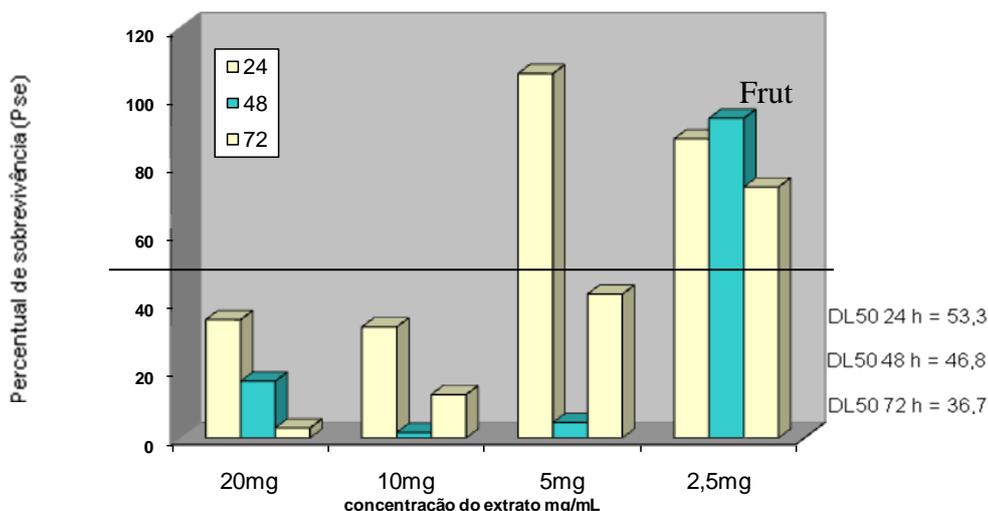


Figura 18. Cálculo da  $DL_{50}$  de extrato metanólico obtido do fruto de *Caesalpinia ferrea* para *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

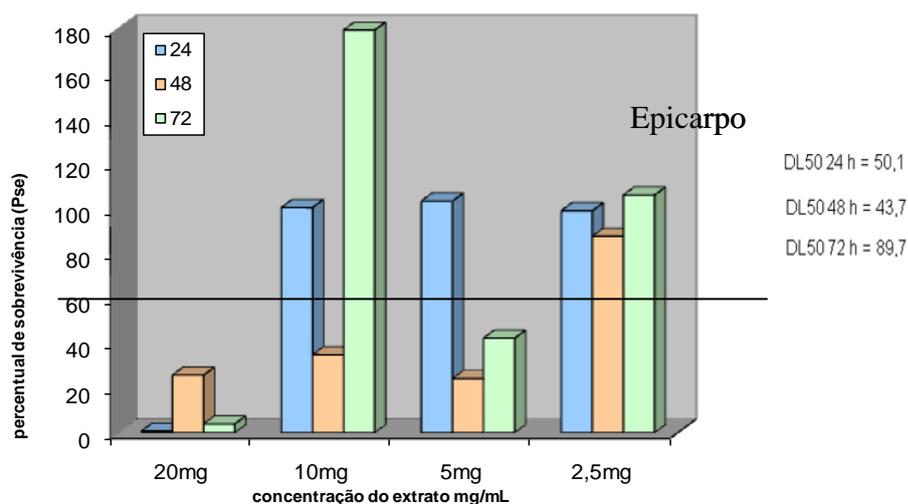


Figura 19. Cálculo da  $DL_{50}$  de extrato metanólico obtido do epicarpo de *Caesalpinia ferrea* para *L.(V.) guyanensis*.

Quando comparado os resultados da tendência de sensibilidade à ação dos extratos metanólicos dos frutos, epicarpos e sementes e extratos hexânicos de sementes obtidos de *C. ferrea*, verificamos uma maior sensibilidade ao extrato metanólico de frutos do que para os epicarpos e sementes para a espécie *L. (V.) guyanensis*. Cortez em 2006, obteve uma  $DL_{50}$  em um ensaio com extrato metanólico de frutos de *C. ferrea*, na concentração de 10 mg/mL/24 h e verificou um percentual de inibição do crescimento no número de formas promastigotas (figura 20).

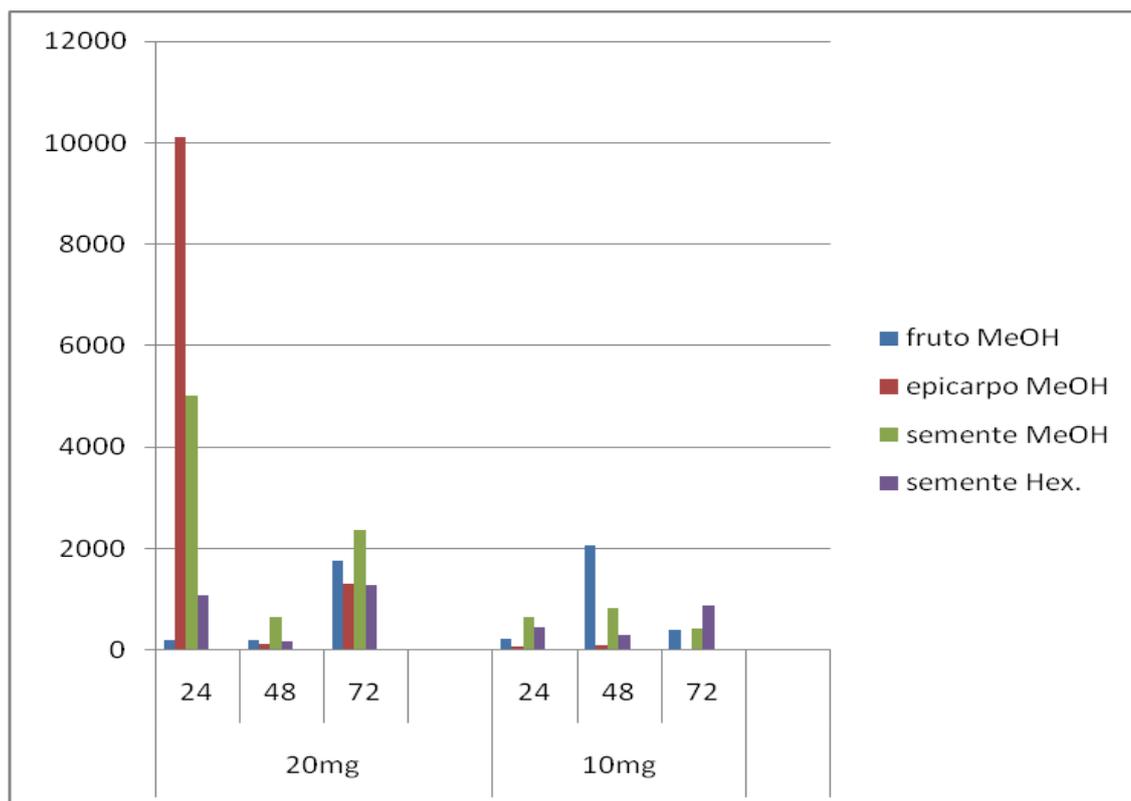


Figura 20. Tendência de sensibilidade ( $tS=PSc./PSe.$ ) às 24, 48 e 72 horas aos extratos obtidos de frutos, epicarpós e sementes de *Caesalpinia ferrea* para *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

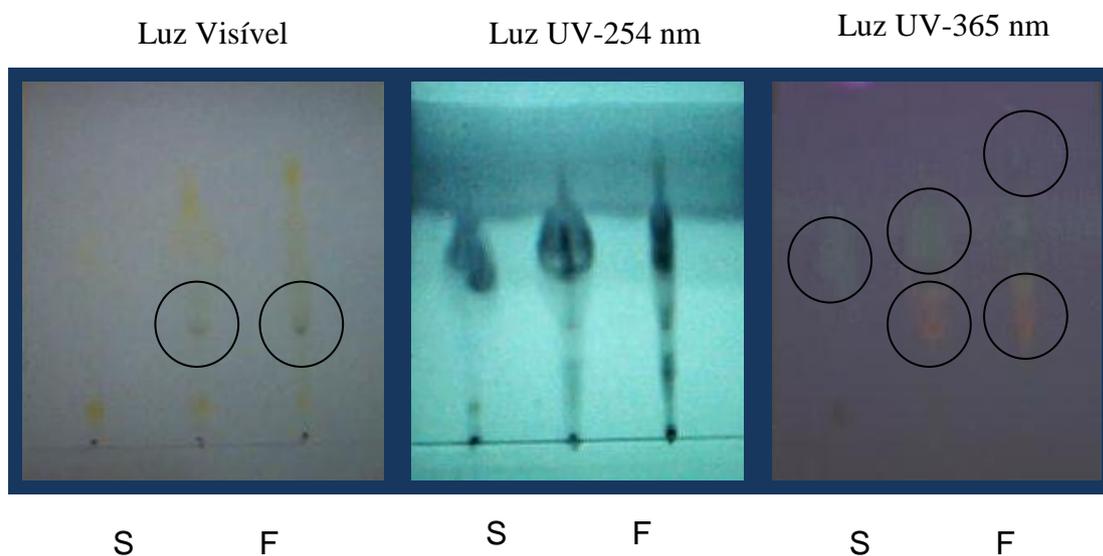
Com a análise desses resultados, apesar de preliminares para uma comprovação do potencial leishmanicida da espécie em estudo, apresentam-se animadores e criam perspectivas para investigações futuras relacionadas à estrutura e atividade dos componentes de cada extrato testado. Para a confirmação do seu interesse, ensaios de atividades na forma amastigota bem como avaliação de suas toxicidades em macrófagos são necessários. Além disso, ensaios *in vivo*, através de diferentes rotas permitem confirmar o interesse biológico destas combinações contra as leishmanioses.

### 5.3 Avaliação do Perfil Cromatográfico

Os extratos hexânicos e metanólicos foram inicialmente submetidos à análise por CCDC. Os melhores sistemas de solventes foram: misturas de Hexano/Acetato de Etila (7:3), Diclorometano/Metanol (3:7) e Diclorometano/Metanol (1:1).

#### 5.3.1 Análise dos Extratos Hexânicos

Abaixo estão apresentados os perfis cromatográficos dos extratos brutos hexânicos das sementes, frutos e epicarpas, respectivamente, de *C. ferrea* eluidos com Hexano e Acetato de Etila (7:3). As amostras foram analisadas por CCDC e reveladas com luz Visível, luz UV-254 nm, Luz UV-365 nm e borrifadas com o reveladore cromatográfico Anisaldeído e Sulfato Sérico.



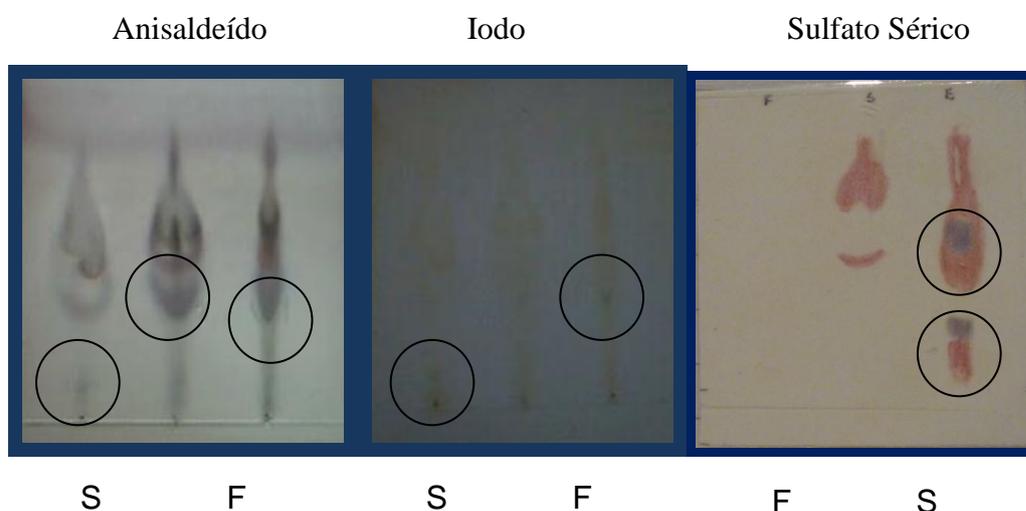


Figura 21. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) de extratos hexânicos de sementes (S), frutos (F) e epicarpos (E) eluidos com Hexano: Acetato de Etila (7:3).

Muitos compostos naturais têm sido investigados e muitos deles tem demonstrado significativa atividade anti-leishmania. Estes compostos pertencem a diferentes classes de substâncias tais como: alcalóides, terpenos, quinonas, lactonas, cumarinas, acetogeninas de anonáceas, chalconas, tetralonas, lignanas e saponinas (AKENDENGUE *et al.*, 1999). A espécie *C. ferrea* apresentou triterpenos, ácido fenólico e flavonóides C-glicosilados: isorientina, orientina e vitexina. Isolou-se da mesma espécie também galato de metila que é um precursor biossintético de metabólitos secundários naturais: cumarinas, lignanas e neolignanas (DEWICK, 1998).

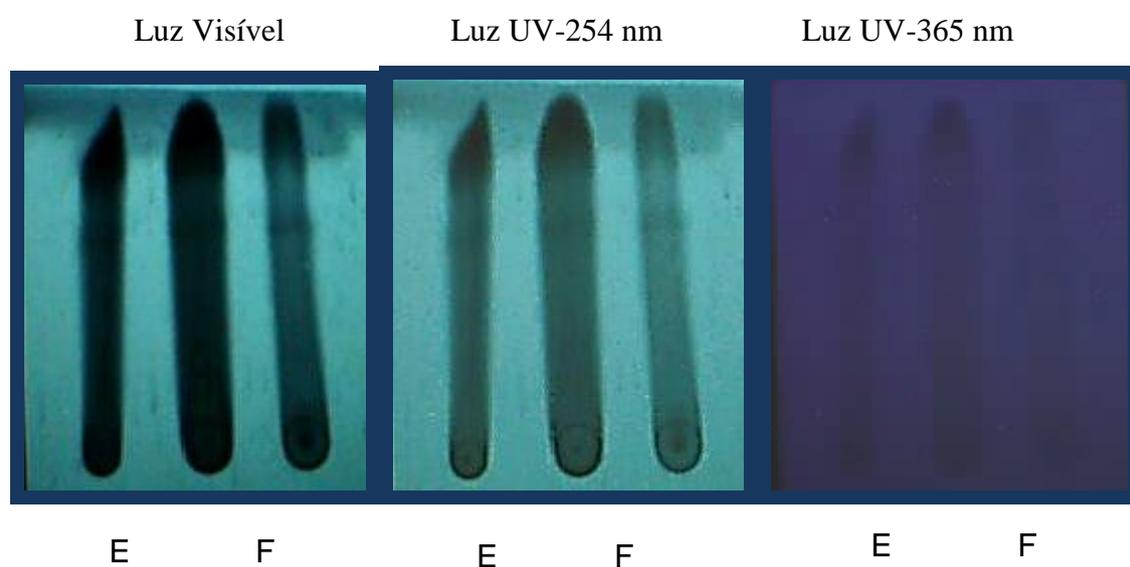
Análises dos cromatogramas no UV (254 nm e 365 nm) apresentaram manchas vermelhas sugerindo a presença de clorofilas ou flavonóides, amarelas e marrons, que podem sugerir a presença de flavonóides e xantonas, vermelhas (taninos ou terpenóides) e outras manchas de cor azul claro (triterpenos e/ou saponinas). Quando houve a revelação dos cromatogramas com solução de anisaldeído, reveladores de terpenos e esteróides em geral,

estes apresentaram manchas amarelas e arroxeadas, o que sugere a presença de flavonóides ou xantonas, saponinas e/ou triterpenos como constituintes majoritários (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

### 5.3.2 Análise dos Extratos Metanólicos

Uma análise preliminar de *C. ferrea* Mart. utilizando reações químicas, foi realizada pelo professor Luiz Cláudio Di Stasi e apresentou o seguinte perfil fitoquímico: esteróides, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis, saponinas, taninos e xantonas (MATOS, 1997).

Os extratos metanólicos de frutos íntegros, epicarpós e sementes foi inicialmente submetido à análise por CCDC. Os melhores sistemas de solventes foram: misturas de Diclorometano/Metanol (3:7) (Figura 22).



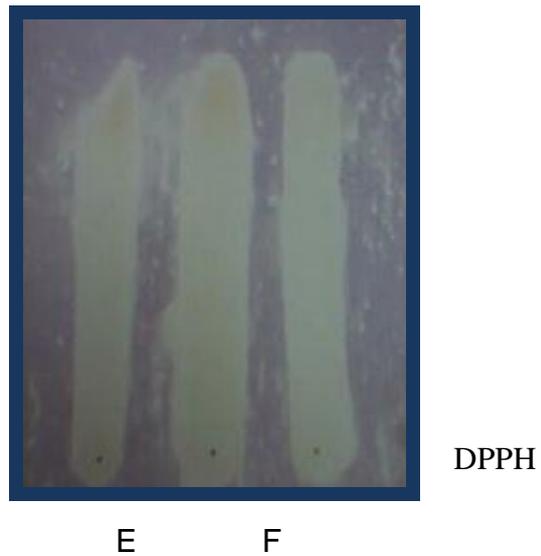


Figura 22. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) de extratos metanólicos de epicarpos (E), frutos (F) e Sementes (S) eluidos com Diclorometano e Metanol (3:7).

Os extratos metanólicos de frutos íntegros (F), epicarpos (E) e sementes (S) foram inicialmente submetidos à análise por CCDC. Os melhores sistemas de solventes foram: misturas de Diclorometano/Metanol (1:1) (Figura 23).

Análise do cromatograma na luz visível, os extratos apresentaram coloração amarelada, enquanto que no UV (254 nm e 365 nm) apresentaram manchas violeta mudando gradualmente para azul escura, sugerindo a presença de cumarinas. Quando se revelou o cromatograma com o revelador cromatográfico  $\text{FeCl}_3$ , apresentou mudança de coloração de azul escuro para azul claro, demonstrando apresentar taninos nos extratos (Figura 23).

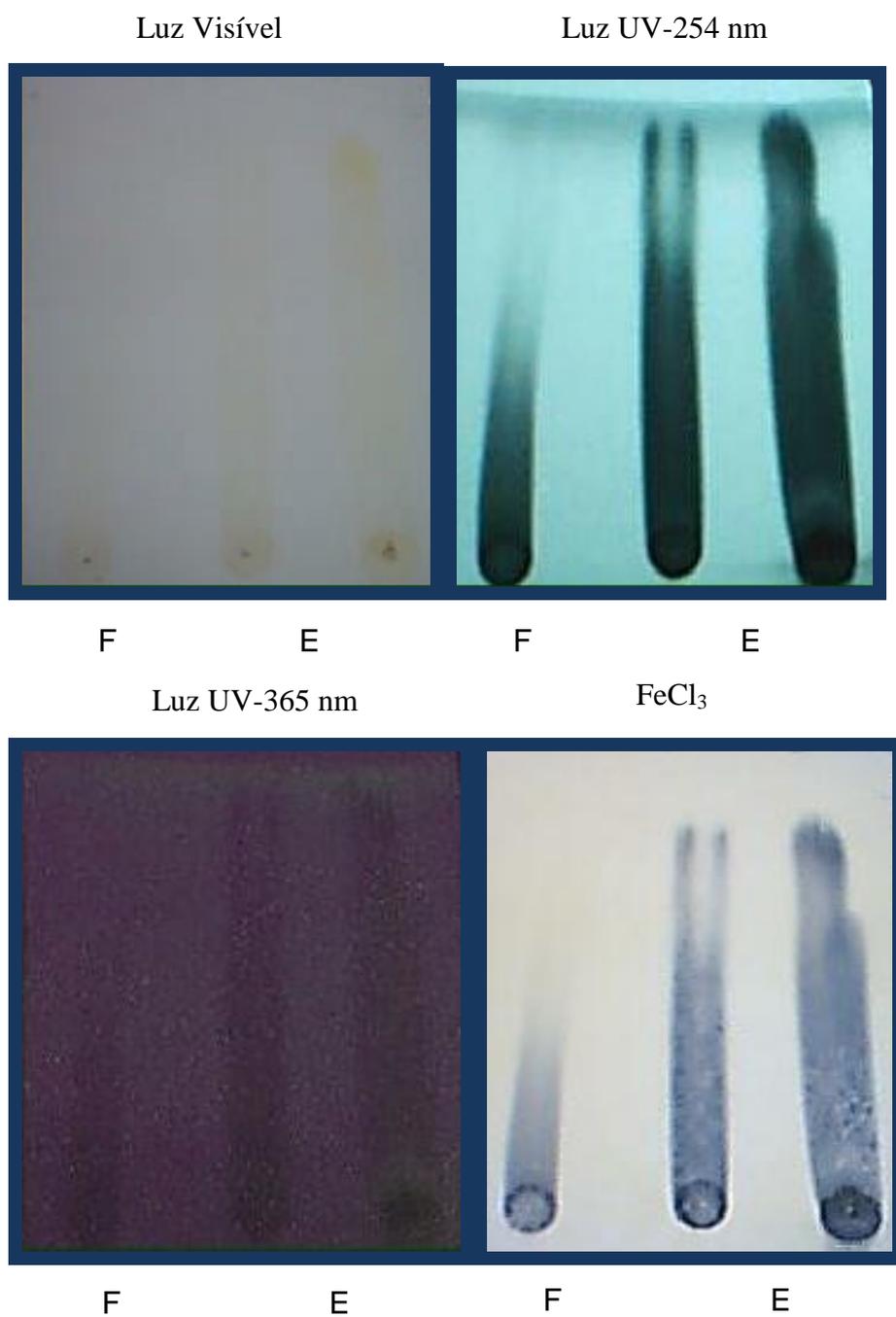


Figura 23. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) de extratos metanólicos eluidos com Diclorometano e Metanol (1:1)

## 5.4 Análise de Espectros Provenientes de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Nas figuras a seguir, demonstram-se os deslocamentos químicos encontrados nos extratos hexânicos de frutos, epicarpós e sementes de *C. ferrea*, demonstrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos compostos orgânicos analisados.

### 5.4.1 Análise de Espectros de Extratos Hexânicos

O espectro do extrato hexânico dos frutos íntegros de *C. ferrea* em RMN de  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de alguns sinais no deslocamento de hidrogênios na análise, como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos  $\alpha$ -monossustituídos, alquinos, alifáticos  $\beta$ -sustituídos e alifáticos alicíclicos. Evidenciou-se um sinal mais forte nos alifáticos  $\beta$ -sustituídos.

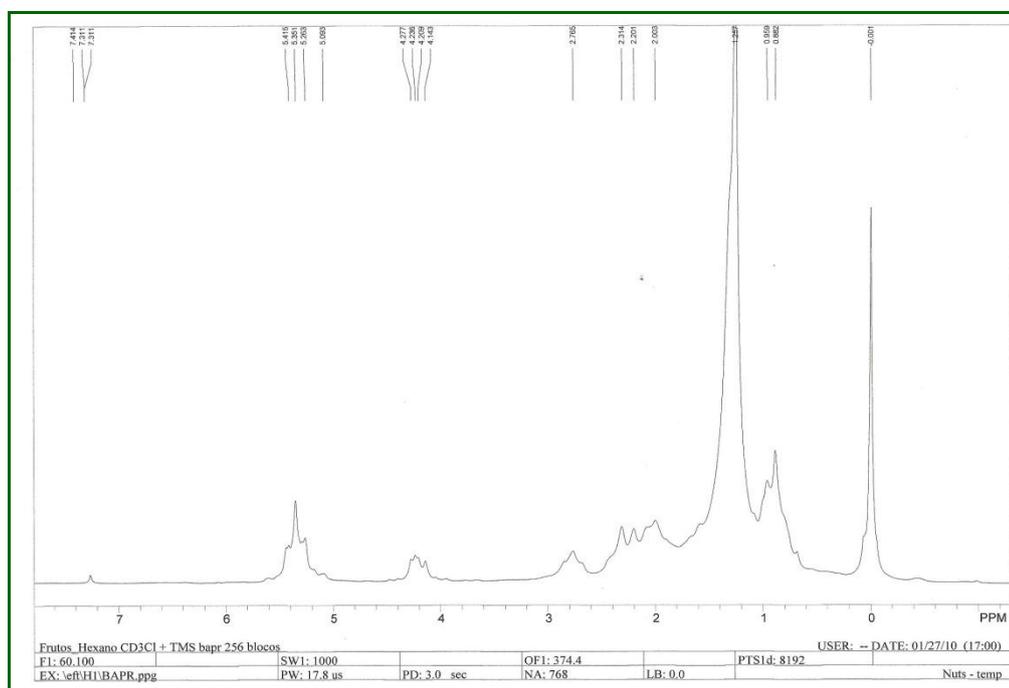


Figura 24. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do extrato hexânico do fruto de *Caesalpinia ferrea*.

O espectro do extrato hexânico das sementes de *C. ferrea* em RMN de  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de alguns sinais no deslocamento de hidrogênios na análise, como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, Alifáticos  $\alpha$ -dissubstituídos e  $\alpha$ -monossubstituídos, alquinos, alifáticos  $\beta$ -substituídos e alifáticos alicíclicos. Evidenciou-se um sinal mais forte nos alquenos, alifáticos  $\beta$ -substituídos e alifáticos alicíclicos.

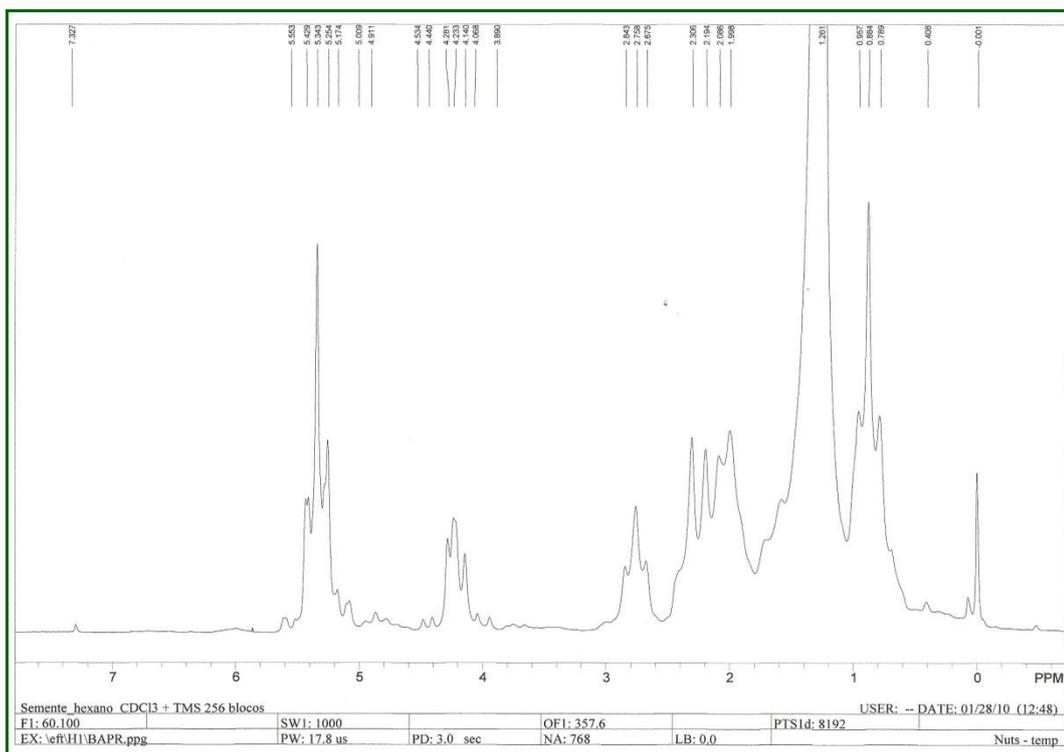


Figura 25. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do extrato hexânico da semente de *Caesalpinia ferrea*.

O espectro do extrato hexânico dos epicarpós de *C. ferrea* em RMN de  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de alguns sinais no deslocamento de hidrogênios na análise, como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos  $\alpha$ -dissubstituídos e  $\alpha$ -

monossustituídos, alquinos, alifáticos  $\beta$ -sustituídos e alifáticos alicíclicos. Evidenciou-se um sinal mais forte nos alifáticos  $\beta$ -sustituídos.

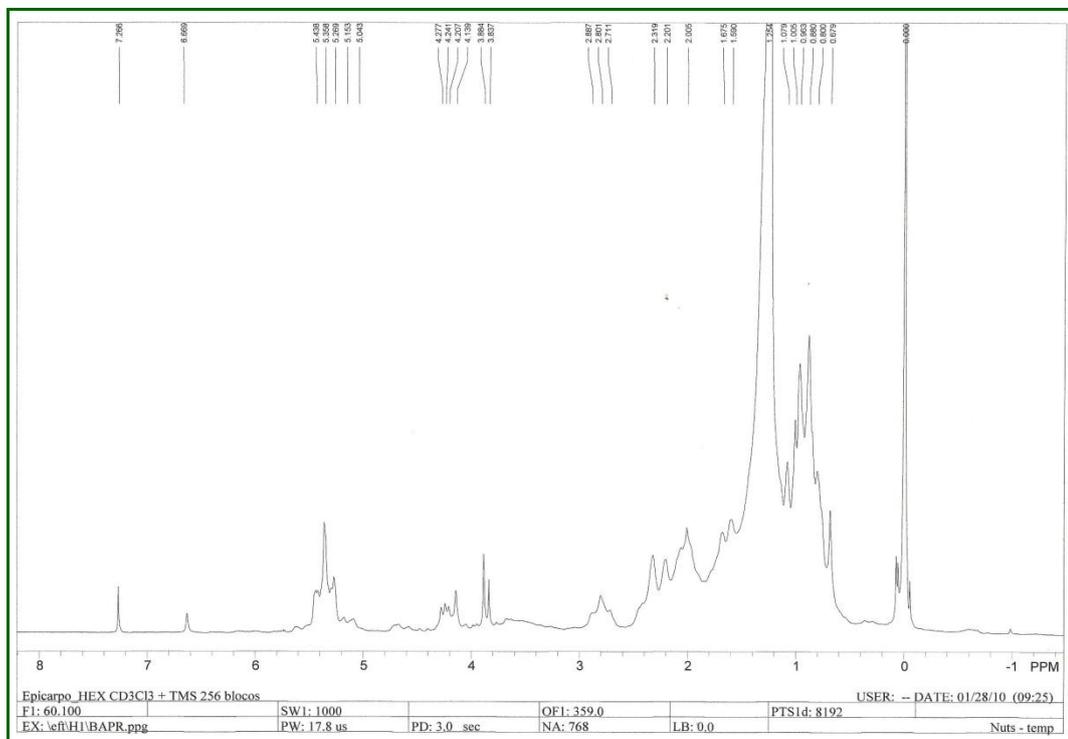


Figura 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do extrato hexânico de epicarpo de *Caesalpinia ferrea*.

#### 5.4.2 Análise de Espectros de Extratos Metanólicos

O espectro do extrato metanólico dos frutos íntegros de *C. ferrea* em RMN de  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de alguns sinais no deslocamento de hidrogênios na análise, como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos  $\alpha$ -dissustituídos e  $\alpha$ -monossustituídos, alquinos e alifáticos  $\beta$ -sustituídos. Evidenciou-se um sinal mais forte nos alquinos e alifáticos  $\alpha$ -monossustituídos.

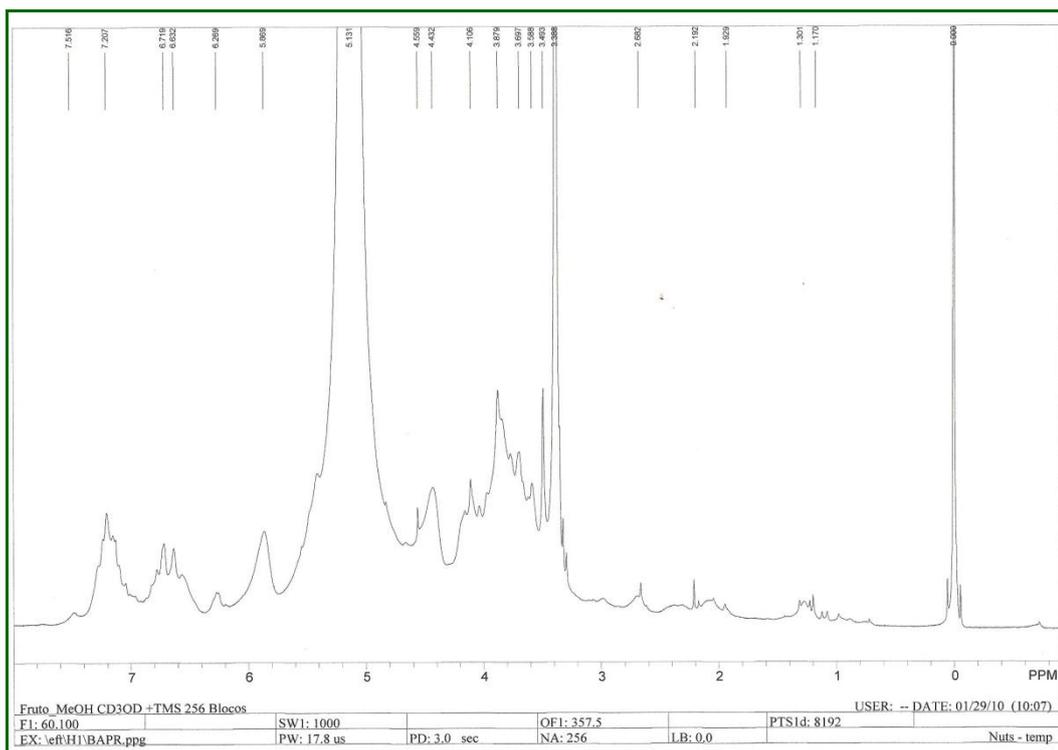


Figura 27. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do extrato metanólico de fruto de *Caesalpinia ferrea*.

O espectro do extrato metanólico das sementes de *C. ferrea* em RMN de  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de alguns sinais no deslocamento de hidrogênios na análise, como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos  $\alpha$ -dissubstituídos, alquinos, alifáticos  $\beta$ -substituídos e alifáticos alicíclicos. Evidenciou-se um sinal mais forte nos alifáticos  $\alpha$ -dissubstituídos e  $\alpha$ -monossubstituídos,

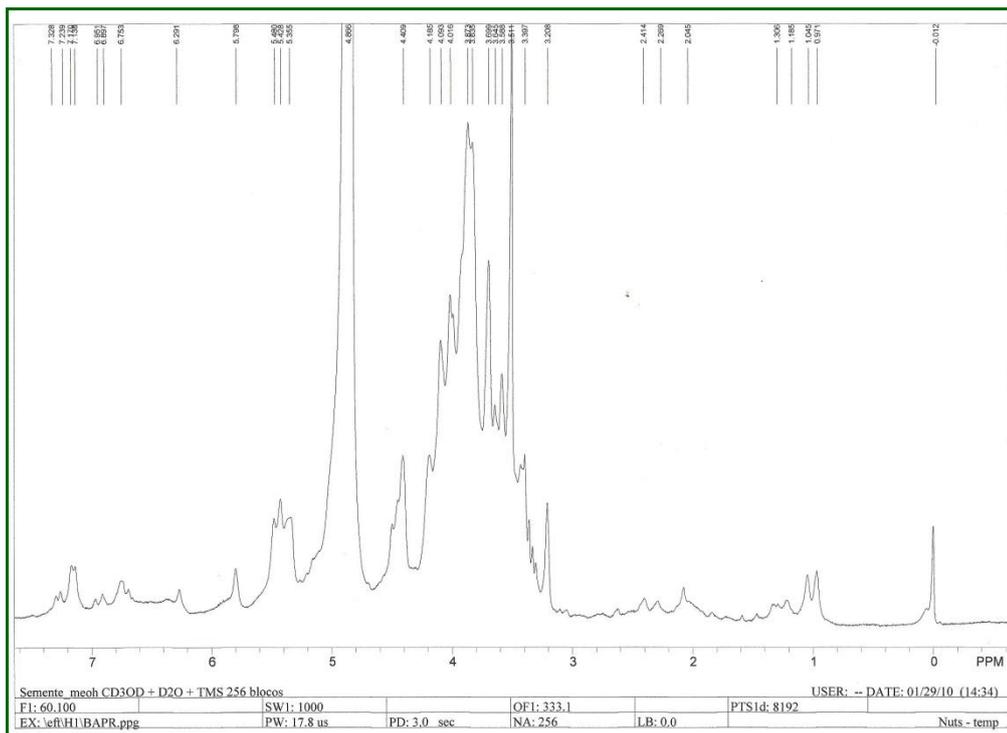


Figura 28. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do extrato metanólico de semente de *Caesalpinia ferrea*.

O espectro do extrato metanólico dos epicarpós de *C. ferrea* em RMN de  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de alguns sinais no deslocamento de hidrogênios na análise, como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos  $\alpha$ -dissubstituídos e  $\alpha$ -monossubstituídos, alquinos e alifáticos  $\beta$ -substituídos. Evidenciou-se um sinal mais forte nos alquenos e alifáticos  $\alpha$ -monossubstituídos.

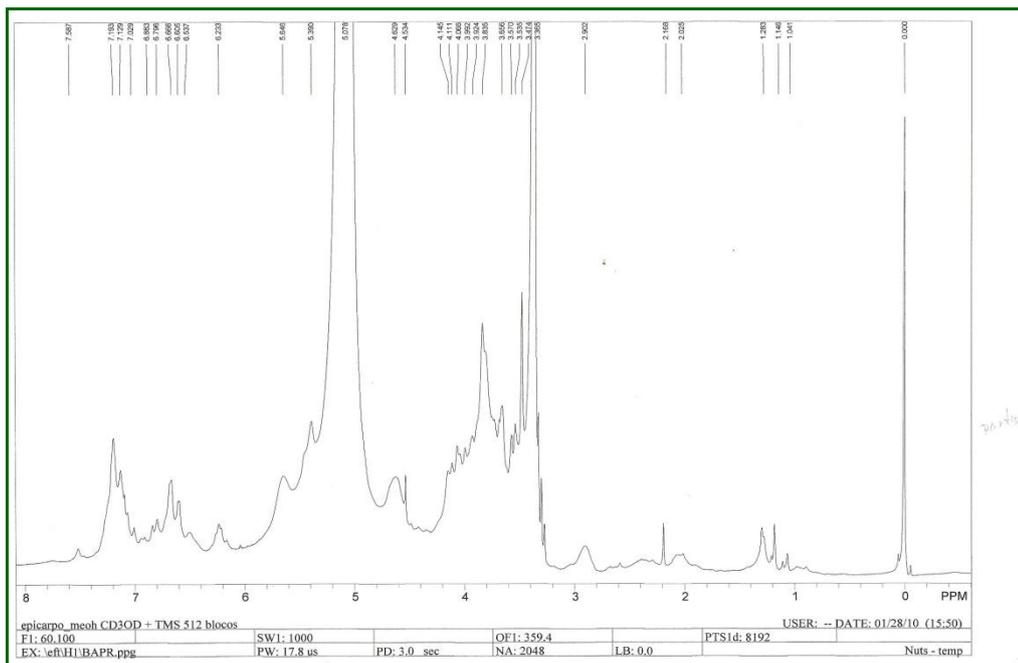


Figura 29. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 60 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do extrato metanólico de epicarpo de *Caesalpinia ferrea*.

## 5.5 Prospecção Fitoquímica

Na tabela 2 são apresentados os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos analisados de acordo com os ensaios descritos por MATTOS (1997).

Tabela 2

Prospecção Fitoquímica dos Extratos Brutos de *Caesalpinia ferrea*

Classes de Substâncias	Extratos Brutos Frutos Íntegro		Extratos Brutos Epicarpos		Extratos Brutos Sementes	
	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex
	Triterpenos	-	+	-	+	-
Terpenóides		+		+		+
Flavonóides	+	-	+	-	+	-
Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	-	-	-	-	-	-
Favonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas	-	+	-	+	-	+
Taninos	-	+	-	+	-	+
Atividade Anti-oxidante	+	-	+	-	+	-
Saponinas	-	+	-	+	-	+

Convenção: (-) ausente, (+) presente.

Observou-se que os frutos, epicarpos e sementes apresentaram praticamente a mesma classe de substâncias nos diferentes extratos, mesmo porque o extrato dos frutos é composto pela junção de epicarpos e sementes.

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo complexo e moroso que requer além de uma sofisticada infra-estrutura e equipes multidisciplinares, um considerável aporte de recursos financeiros. O fármaco a ser colocado no mercado tem que ter propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desejáveis (meia vida de pelo menos 12 horas, capacidade de penetrar o citoplasma celular e atingir a molécula alvo) e não causar efeitos colaterais (TROUILLER *et al.*, 2001; URBINA; DOCAMPO, 2003). A importância de se trabalhar com compostos sintetizados reside na possibilidade de alterações dirigidas na estrutura química, incluindo ou substituindo radicais à molécula para torná-la mais ativa e direcionada para alvos específicos e desta forma aumentar sua atividade específica e minimizar seus efeitos colaterais.

Analisando quimicamente o extrato metanólico de frutos e epicarpos, os quais demonstraram atividade leishmanicida, verificou-se a presença de substâncias como a

clorofila, flavonóides, xantonas, taninos, triterpenos e saponinas como constituintes majoritários, além de apresentar atividade antioxidante. Os resultados obtidos neste estudo mostram que as pesquisas com *C. ferrea* continuam sendo alvo de interesse para o desenvolvimento de um novo fármaco no tratamento das leishmanioses sugerindo que o extrato metanólico de frutos e epicarpo de *C. ferrea* pode ser considerado como uma importante alternativa no tratamento das leishmanioses, propondo a realização de testes farmacológicos e toxicológicos *in vivo* desses extratos, realizando outros fracionamentos a fim de se confirmar alguma substância de melhor atividade leishmanicida.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo:

6.1 Nas condições de cultivo padronizadas, foi possível obter promastigotas axênicos de *Leishmania (Viannia) guyanensis* que apresentaram inibição/redução ou estimulação do crescimento *in vitro* quando em presença de certas concentrações e tipos de extratos metanólicos e hexânicos de frutos, epicarpos e sementes de *C. ferrea*. Sendo assim, a atividade leishmanicida dos extratos metanólicos de frutos e epicarpos da espécie, foi evidenciada para *L. (V.) guyanensis*. No entanto, frações semi purificadas desses extratos devem ser avaliadas mais minuciosamente, principalmente as polares, com o objetivo de verificar sua potencial aplicação;

6.2 Confirmou-se a existência da atividade leishmanicida em dois dos quatro extratos testados. Os extratos metanólicos de frutos e epicarpos da espécie *C. ferrea* apresentaram resultados promissores quanto à atividade inibitória da proliferação intracelular na concentração de 20 mg/mL/24h. Estes apresentam como constituintes principais terpenos, triterpenos, clorofila e compostos fenólicos, possivelmente flavonóides demonstrando atividade antioxidante. Entretanto, ainda se faz necessário a realização de análise de frações desses extratos para a verificação de substância (s) responsável (veis) pela atividade inibitória;

6.3 Nas condições experimentais utilizadas nos ensaios, verificou-se maior atividade leishmanicida para *L.(V.) guyanensis* (DL<sub>50</sub> 20 mg/mL/24h) nas atividade dos extratos metanólicos de frutos e epicarpos do que nas sementes, ocasionada pela ação *in vitro* de *C. férrea*;

6.4 O extrato hexânico na maior concentração testada, obtido das sementes desta planta nas condições experimentais utilizadas não apresentou atividade inibitória contra formas promastigotas da *L. (V.) guyanensis*. Entretanto, o resultado obtido do ensaio biológico,

demonstrou que o extrato das sementes foi estimulatório para as formas promastigotas do parasito;

6.5 Através das análises comparativas envolvendo resultados obtidos por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  combinado com ensaios biológicos biomonitorados foi possível elucidar alguns deslocamentos químicos encontrados nos extratos como aromáticos e heteroaromáticos, alquenos, alifáticos  $\alpha$ -monossustituídos e  $\alpha$ -dissustituídos, alquinos, alifáticos  $\beta$ -sustituídos e alifáticos alicíclicos;

6.6 Os compostos mais promissores para futuros estudos *in vivo* são os compostos fenólicos e terpenóides presentes nos extratos metanólicos de frutos e epicarpós da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart.;

Devemos salientar que este trabalho representa uma importante contribuição para o estudo do conhecimento dessa espécie presente Amazônia, à medida que apresenta os dados farmacológicos, complementado pelo estudo fitoquímico. Esses dados são de grande importância à população, não só sob o ponto de vista de valorização do conhecimento tradicional da população local, mas também sob o aspecto econômico e ecológico, aonde estas confirmações de atividade leishmanicida abre questões apontando para a necessidade de novas investigações quimiotaxonômicas da família.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKENDENGUE, B.; ROBLOT, F.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Klavanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. **Phytochemistry** 59, p. 885-888, 2002.

AKENDENGUE, B., NGOU-MILAMA, E., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite** 6: 3-8, 1999.

AKERELE, O. WHA - Assembléia Mundial de Saúde UNIDO - Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Industrial.[homepage da internet]. Curitiba/1989. Disponível em: <http://www.cesamep.hpg.ig.com.br>. 2006.

ALEXANDRE, R.F. **Fitoterapia baseada em evidências: exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina**. [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.

ALEXANDER, D.B; ZUMBERER, D.A. 15N<sub>2</sub> fixation by bacteria associated with maize roots at low partial O<sub>2</sub> pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p. 1748-53, 1989.

ALMEIDA, R.P., ROCHA, P., JESUS, A.R., COSTA, J., CARVALHO, E.M. Evaluation of cellular immune responses in patients with different clinical forms of tegumentary leishmaniasis. **Allergy Imm** 14:1-9, 1995.

ALVES, W.A.; SENA, J.M.; GOMES, M.L.S.; ELKHOURY, A.N.S.M. Leishmaniose: Situação Atual no Brasil. Informações retiradas do site: <http://www.saude.gov.br/sinanweb>, em 19/08/2008.

ALZUGARAY, D. & ALZUGARAY, C. Flora Brasileira – **Prim. Enciclo. de Plant. do Bra.** 1: 65-66, 1984.

AMATO, V.S., DUARTE, M.I., NICODEMO, A.C., DE CARVALHO, L.V., PAGLIARI, C., DA MATTA, V.L., *et al.* An evaluations of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 40:23-30, 1998.

ARIAS, J.R., FREITAS, R.A. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. **Acta Amaz**; 7:507-27, 1977.

ARIAS, J.R. & NAIFF, R. D.. The principal resevoir host of cutaneous Leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, 76 (3): 279-286, 1981.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.

BARBOSA, L. C. A. Introdução à Química Orgânica. **Prentice Hall**. São Paulo, 2004.

BARRET, T.V., SENRA, M.S. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. **Parasitol Today**; 5:255-7, 1989.

BELAZZOUG, S. & NEAL, R. A. Failure of meglumine antimoniate to cure cutaneous lesions due to *Leishmania major* in Algeria. **Trans, R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.79, p. 363-365, 1985.

BERMAN, J.D., CHULAY, L.D. HENDRICKS and OSTER, C.N. Susceptibility of clinically sensitive and resistant *Leishmania* to pentavalent antimony *in vitro*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 31 (1982), pp. 459–465, 1982.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERMAN, J.D. Human Leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 year. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERTO-GERO, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donavi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Biochem. J.** 315, p. 631-634, 1996.

BRAGANÇA, L.A.R. et al. Plantas Medicinais Antidiabéticas, **EDUFF**, Niterói, p. 10-25, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : **Edit. do Min. da S.**, 2007.

BORRÁS, L.; MADDONI, G.; OTEGUI, M.E. Leaf senescence in maize hybrids: plant population, row spacing and kernel set effects. **Field Cro. Res.**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 13-26, 2003.

BOYOM, F.F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry** 64, p. 1269-1275, 2003.

BRYCESON, A.D.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 63:708-737, 1969.

CANTO-CAVALHEIRO, M.M. **Estudo de compostos sintéticos com atividade tripanomicida. Avaliação da relação estrutura x atividade.** Tese de doutorado em Biologia Parasitária. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz/ Instituto Oswaldo Cruz, 113 pp, 1999.

CARRICONDE, C. **Introdução ao uso de fitoterápicos nas patologias de APS:** direcionado aos profissionais do Programa Saúde da Família. Olinda; 2002.

CARVALHO, E.M., BARRAL, A., COSTA, J.M., BITTENCOURT, A., MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Ac. Trop.**, v.56, n. 4, p. 315-325, 1994.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C. et al. Preliminary studies of analgesic and antiinflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **J. of Ethnophar.** v. 53, p. 175-8, 1996.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S.; Introdução a métodos cromatográficos, 7a ed., **Edit. da Unic.**, Campinas, 1997.

CONVIT, J., KERDEL-VEGAS, F., GORDON, B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **Brit J Derm** 74:132-135, 1962.

CONVIT, J., PINARD, M.E., RONDON, A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 603-610, 1972.

CONVIT, J., ULRICH, M., FERNANDEZ, C.T., TAPIA, F.J., CACERES-DITTMAR, G., CASTES, M., RONDON, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.87, n. 4, p. 444-448, 1993.

CORTEZ, A.C.A. **Avaliação da atividade “in vitro” dos extratos fitoquímicos de *Caesalpinia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Caesalpinaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, p. 7, 2004.

COSTA, J.M.L., MARSDEN, P.D., LLANOS-CUENTAS, E.A., NETTO, E.M., CARVALHO, E.M., BARRAL, A., ROSA, A.L., CUBA, C.A., MAGALHÃES, A.V., BARRETO, A.C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a Field clinic in Bahia. A report of eight cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.89, p. 319-323, 1986.

COSTA, J.M., VALE, K.C., FRANCA, F., SALDANHA, A.C., DA SILVA, J. O., LAGO, E.L., MARSDEN, P.D., MAGALHÃES, A. V., E SILVA, C.M. SERRA NETO, A., et al. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, n. 4, p. 205-208, 1990.

COSTA, J.M.L., SALDANHA, A.C.R., NASCIETO, D., SAMPAIO, G., CARNEIRO, F., LISBOA, E., SILVA, M., BARRAL, A. Modalidades Clínicas, Diagnósticos e Abordagem Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, 79 (Supl.3): 70-83, 2009.

COURA, J.R., FERNANDES O., ARBOLEDA, M., BARRETT, T.V., CARRACA, N., DEGRAVE, W. & CAMPBELL, D.A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.** 90: 278-279, 1996.

CROFT, S.L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94 (2), p. 215-220, 1999.

CROFT S.L., SUNDAR S, FAIRLAMB A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev.** v.19, p. 111-126, 2006.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **New York: Col. Univer. Pres.**, 1262 p, 1981.

CUPOLILLO, E., GRIMALDI-JR., G., MOMEM, H. A general classification of New World *Leishmania* zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg** 50:296-311, 1994.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.M.; ALVES, F.A.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998

DAMAS, F.B. A fitoterapia como estratégia terapêutica na comunidade do saco grande II (Florianópolis, SC) [**trabalho de conclusão de curso**]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Graduação em Medicina; 119p, 2005.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BRENDEL, K.A.; SMITH, D.C.; BURTON, A.H.; DICKER, D.C.; SULLIVAN, K.; FAGAN, R.F. & ARNER, T.G. Epi-Info Version 6.0. 4b. **A Wor. Proces., Data. and Stat. Prog. for Pub. Hea. on IBM Comp. Micro.** Atlanta/Georgia: Centers for Disease Control and Prevention, 1997.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. Leishmaniasis. In: COOK, G.C.; ZUMLA, A. (eds). **Manson's Tropical Diseases..** Londres: W.B. Saunders, p. 1339-1364, 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products.** Chichester: John Willey & Sons, 1998.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M.; HIRUMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia.** São Paulo: UNESP; Suplemento. 193p. 365p. 1989.

DI STASI, L. C.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M. Fabales medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** São Paulo: Fundação Editora Unesp, São Paulo, cap. 18, p. 276-320, 2002a .

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. Simões CMO (org.).In: **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed.da UFSC / UFRGS; P. 108-122, 2003.

ERCOLI, N. Drug responsiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v. 19, p. 320-326, 1966.

FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M.. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro, R.J., **Ed. Guanabara Koogan.** 2ª Ed., 302 p, 2001.

FIGUEIRA, L. P.; ZANOTTI, M.; PINHEIRO, F. G. & FRANCO, A. M. R.; Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, n. 5; 2008.

FRANCO, A.M.R.F. **Leishmaniose tegumentar em *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (Marsupialia: Didelphidae): Estudo da infecção experimental por *Leishmania* sp.** Tese submetida para obtenção de grau de mestre em biologia parasitária. Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Julho 1990.

GASSER, R.A.JR., MAGILL, A.J., OSTER, C.N., FRANKE, E.D., GROGL, M., BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 18, n. 1, p. 83-90, 1994.

GEETHA, T.; VAR ALAKSHMI, P.; LATHA, M. R. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupel linoleate in rats. *Journal Ethnopharmacology*, v. 76, p. 77-80, 2001.

GENARO, O.; MICHALICK, M.S.M. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. *et al. Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu., p. 67-83, 2005.

GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. *et al. Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu., p. 47-66, 2005a.

GONZALEZ, F.G.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia férrea* Mart. In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo. *Rev. Brasil. de Ciênc. Farmac.* São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, v. 40., p.79, 2004.

GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:71-80, 2003.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A. Amazônia: Tesouro químico a preservar. *Ciência Hoje*, Editora Abril, V. 11, no. 61, p. 19-21, 1990.

GUERRA, J.A.O.; RIBEIRO, J.A.S.; COELHO, L.I.A.R.C.; BARBOSA, M.G.V., PAES, M.G. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad. Saúde Pública* vol. 22 no.11, 2006.

HENDRICKS, L.D., WOOD, D.E. & HADKUK, M.E.. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76: 309-316, 1978.

HEPBURN, N. C. Thrombocytopenia complicating sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.87, n. 6, p. 691, 1993.

HEPBURN, N.C.; SIDDIQUE, I.; HOWIE, A.F.; BECKETT, G.J.; HAYES, P.C. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 88, p. 453-455, 1994.

HIROSHI, N., HAYASHI, K., KIDO, M., KAKUMOTO, K., IKEDA, S., MATSUURA, N., TANI, H., TAKAOKA, D., IINUMA, M. AND AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone

trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferr, ea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Revis. Elsevier**, 2007.

JAFFE, C.L., GRIMALDI, Jr., G. & MCMAHON-PRATT, D.. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel, C.M- (ed.), Genes and Antigens of Parasites. **A Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> Ed. Fundação Oswaldo Cruz, RJ, pp.47-91, 1984.

KOFF, A. B., ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 5, p. 693-708, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis in Latin-america. **Nature** 273: p. 595-600, 1978.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A. ed. **Biology of the Kinetoplastida**. London, Academic Press v. 2, p. 1-116, 1979.

LAINSON, R., SHAW, J.J., READY, P.D., MILES, M.A., PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies wild mammals and man in north Pará State with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* agent of “pian-bois”. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; 75:530-6, 1981.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; 18:47-56. 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniasis**. Acad. Press Inc., London., p. 100-128, 1987.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. New World leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Krier JP, Wakelin D, editors. **Topley & Wilson’s microbiology and microbial infections**. v. 5. London: Arnold; p. 241-66, 1998.

LESSA, H.A., MACHADO, P., LIMA, F., CRUZ, A.A., BACELLAR, O., GUERREIRO, J. *et al.* Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am J Trop Med Hyg**, 65:87- 89, 2001.

LLANOS CUENTAS, E.A., CUBA, C.C., BARRETO, A.C., MARSDEN, P.D. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 845-846, 1984.

LÉONARD, A. & GERBER, G. B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of compounds. **Mutation Res.**, v. 366, p. 1-8, 1996.

LORENZI, H. *et al.* Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas, Nova Odessa - São Paulo: **Plantar.**, 2002.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F., FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbezyloquinoline alkaloids from *Gutteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry** 54, p. 709-716, 2000.

MAINZER, F. & KRAUSE, M. Changes of the electrocardiogram appearing during antimony treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 702-709, 1940.

MARSDEN, P.D. Mucosal Leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 80:859-76, 1986.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia–Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 27:93-101, 1994.

MATOS, F.J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. **Edições UFC**, 128 p., Fortaleza, 1988.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições EUFC, 1997.

MENEZES, I.A.C.; MOREIRA, I.J.A.; CARVALHO, A.A.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, M.R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascul. Pharmac.** 47, p. 41-47, 2007.

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E. de; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 100, v. 7, p. 783-787. 2005.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, p. 41-46, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE., Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 182p. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINANWEB) [Internet]. Brasília: [Acesso em 01/02/2008] Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar, distribuição de casos confirmados por unidade federada. Brasil, 1980 a 2005. [citado 2009 mar. 25]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=25340](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=25340).

MONTENEGRO, H.; GUTIÉRREZ, M.; ROMERO, L.I.; ORTEGA-BARRIA, E.; CAPSON, T.L.; RIOS, L.C. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. With leishmanicidal activity. **Planta Médica** 69, p. 677-679, 2003.

MORIEARTY, P., BITTENCOURT, A.L., PEREIRA, C., TEIXEIRA, R., BARRETO, C., GUIMARÃES, N.A. Borderline cutaneous leishmaniasis. Clinical, immunological and histological differences from mucocutaneous leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 20:15-21, 1978.

MUKHERJEE, P.K., WAHILE, A. integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other India system of medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 nov; 103: 25-35, 2006.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, n. 336, p. 1561-1577, 2005.

NAIFF, M.F. **Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região.** Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, p. 1998.

NAIFF, M.F., CUPOLILLO, E., NAIFF, R.D., MOMEN, H., BARRET, T.V., GRIMALDI, Jr. G. Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**; 32 Suppl 1:243, 1999.

NAKAMURA, E.S., KUROSAKI, F., ARISAWA, M., MUKAINAKA, T., OKUDA, M., TOKUDA, H., NISHINO, H. and PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Lett** 177:119-124, 2002a.

NAKAMURA, E.S., KUROSAKI, F., ARISAWA, M., MUKAINAKA, T., TAKAYASU, J., OKUDA, M., TOKUDA H., NISHINO, H. and PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two stage skin carcinogenesis. **J. Ethnopharmacol.** 81:135-137, 2002b.

NASCIMENTO, M.P.S.C.B.; OLIVEIRA, M.E.; MIURA, C.L.Q.; REIS, J.C.B.; NASCIMENTO, H.T.S.; LEITE, J.M.B.; LOPES, J.B.; RIBEIRO, V.Q. Potencial forrageiro do pau-ferro. In: **Bol. de Pesq. e Desenvol.**, 41. Teresina: Embrapa, Outubro, 16 p., 2002.

NETTO, E.M., TADA, M.S., GOLIGHTLY, L., KALTER, D. C., LAGO, E., BARRETO, A.C., MARSDEN, P.D. Conceitos de uma população local a respeito da leishmaniose mucocutânea em uma área endêmica. **Ver, Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 33-37, 1985.

NICOLLE, G.L.. Culture du parasite du Bouton d'Orient. C.R. **Acad. Sci.**, 146: 842-843, 1908.

NOVY, F.G., MACNEAL, W.J.. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **J. Infect. Dis.**, 1: 1-30, 1904.

OKELO, G.B.A., SANG, D., BMARTT, K.M. The treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis: report of two cases. **East Afr Med J.** 68:67-68, 1991.

OLLIARO, P. L. & BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Tod.**, v. 9, n. 9, p. 323-328, 1993.

OMS. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** Ginebra: OMS; 2002.

PAJOT, F.X., LE PONT, F., GENTILE, B., BESNARD, R. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 76:112-3, 1982.

PEARSON, R.D. & SOUZA, A. Q. Leishmania species: visceral (Kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: MANDELL, G.L., BENNETT, J., DOLIN, R. (Eds.). **Princ. and Prac. of Infec. Dis.**. New York: Churchill Livingston,. Cap. 252, p. 2066-2077, 1995.

PESSÔA, S.B. Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. **Arq Hig São Paulo**. 26:41-50, 1961.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusion test for viability. In: KRUSE Jr, P.F.; PATTERSON, Jr.M.H. Tissue Culture: methods and application. New York, **Academic Press**., p. 406-408, 1973.

PINTO, E. A. T. **Atividade de extratos de *Anchietia salutaris* St. Hil. e *Caesalpinia ferrea* Mart. sobre a secreção de mastócitos de pulmão e intestino de cobaia. Comparação com drogas antialérgicas.** 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2000.

PINTO, C.A.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova** 25 supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIO CÔRREA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, V.6, 1975.

PIO-CORRÊA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, **Imp. Nac.**, v.3, p.238-239; v.5, p.108-129, 1984.

QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A. Pseudoephedrine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products** 59, p. 438-440, 1996.

REES, P.H., KAGER, P.A., OGADA, T., EEF TINCK SCHATTENKERK, J-K.M. The treatment of kala azar: a review with comments drawn from experience in Kenya. **Trop. Geog. Medic.**, v.37, p. 37-46, 1985.

REITHINGER R.; DUJARDIN J.; LOUZIR H.; PIRMEZ C.; ALEXANDER B.; BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet infectious disease*. v.7 n.9 p.581-596, 2007.

RIBEIRO, F.A.Q., LOPES, F. O. Doenças ulcerogranulomatosas em Otorrinolaringologia. In: Lopes Filho O, Campos CAH. **Tratado de otorrinolaringologia**.1.ed., Rocca: São Paulo.71-75, 1994.

RIBEIRO, J.E.L. da S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E. da C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra Firme na Amazônia Central.** DPID (Departamento for International Development), Manaus-AM. 816 p Il, 1999.

ROMERO, G.A.S., GUERRA, M.V.F., PAES, M.G., MACÊDO, V.O. Comparison of Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 65: 456-465, 2001.

SANDS, M., KRON, M. A., BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Rev. Infect. Dis.**, v.7, p. 625-634, 1985.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. Porto Alegre: Rígel, 208 p. 1989.

SCHUBACH, A., CUZZI-MAYA, T., OLIVEIRA, A.V., SARTORI, A., DE OLIVEIRA-NETO, M.P., MATTOS, Ms., *et al.* Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American Tegumentary Leishmaniasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 96:987-996, 2001.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., De SOUZA, A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. **A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite**; 9:43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., CORBETT, C.E.P. Clinical and immunological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazon Brazil – **A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz**. 99:239-251, 2004.

SOUZA, A.B., SOUZA, L.M.S., CARVALHO, J.C.T. and MAISTRO, E.L., No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats, **Genetics and Molecular Biology** , pp. 380–383, 2006.

TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; KIUCHI, F. *In vitro* Leishmanicidal constituents of *Millettia pendula*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, n. 54, v. 6, p. 915 – 917, 2006.

TALHARI, S.; ARIAS, J.A.; CUNHA, M.G.S.; NAIFF, R.D.; NAIFF, M.F.; FREITAS, R.A.; BARRETT, T. Leishmaniose no Estado do Amazonas- Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. **Na. Bras. Derm.** 63 (6): p. 433-438, 1988.

TITUS, R.G. & RIBEIRO, J. M.C. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v. 239, p. 1306-1308, 1988.

TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; MEIRELLES, M.N.; Rossi-Bergmann, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Bethesda, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

TRACY, J. W. & WEBSTER JR., L.T. Fármacos usados no Tratamento das Protozoonoses. In: GOODMAN & GILMAN, A. (ed.). **As Bas. Farmacol. da Terapêu.** 9ª. Ed. São Paulo: McGraw Hill do Brasil, Cap. 41, p. 725-740, 1996.

TROUILLER, P.; TORREELE, E.; OLLIARO, P.L.; WHITE, N.; FOSTER, S.; WIRTH, D.; PÉRCOUL, B. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? **Trop. Med. Int. Health.**, v. 6, n. 11, p. 945-51, 2001.

- UEDA, H., TACHIBANA, Y., MORIYASU, M., KAWANISHI, K. and ALVES, S.M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phitomed.**, Vol. 8 (5), pp. 377-381, 2001.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v.19, n.11, p.495-501, 2003.
- VIANNA, G. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 4a. Sessão Ordinária. **Arch. Brasil, Med.**,v.2, p. 422, 1912.
- VOULDOUKIS, I., ROUGIER, S., DUGAS, B., PINO, P., MAZIER, D., WOEHLÉ, F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of *in vitro* leishmanicidal activity of marbofl oxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Vet Parasitol.**; 135:137-46, 2006.
- WAECHTER, A.I.; FERREIRA, M.E.; FOURNET, A. DE ARIAS, A.R.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Experimental treatment cutaneous leishmaniasis with argetilactone isolated from *Annona haematantha*. **Planta Medica.** 63 (05): 433-435, 1997.
- WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.
- WALTON, B.C.; SHAW, J.J. & LAINSON, R.. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania brasiliensis*. **J. Parasitol.** 63: 118-119, 1977.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. Geneva: World Health Organization; (Technical Report Series, 793), 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, **TDR NEWS**. Antimonials large-scale failure in leishmaniasis alarming, v.34, p. 1, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Life cycle of *Leishmania* sp. 2004b. (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>)