

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE

**Atividade anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania ferrea* e  
estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma  
cutânea da Leishmaniose**

CLAUDIA DANTAS COMANDOLLI WYREPKOWSKI

Manaus/Amazonas  
Setembro, 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE**

CLAUDIA DANTAS COMANDOLLI WYREPKOWSKI

**Atividade anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania ferrea* e  
estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma  
cutânea da Leishmaniose**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para Saúde.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, Doutora

Co-Orientador: Pierre Alexandre dos Santos, Doutor

Manaus/Amazonas

Setembro, 2015

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

W993a	<p>Wyrepkowski, Claudia Dantas Comandolli Atividade anti-leishmania in vitro e in vivo de <i>Leishmania</i> ferrea e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose / Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski. 2015 197 f.: il.; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco Coorientador: Pierre Alexandre dos Santos Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Leishmaniose Tegumentar . 2. Produtos naturais. 3. Extratos vegetais. 4. Tratamento tópico. 5. Bioensaios. I. Franco, Antonia Maria Ramos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu filho Nikola,  
por expandir minha alma com um amor  
infinito e incompreensível, me fazendo ter  
maior compaixão e paciência.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicionais, por sempre incentivar os meus estudos, e por suportarem tanto tempo a enorme distância física que foi necessária para a realização deste trabalho.

Ao meu querido esposo, pela paciência durante mais esta etapa, e pelo incentivo de continuar este trabalho. Às minhas irmãs pelo entendimento e apoio durante as decisões profissionais. Aos meus Avós, pelos exemplos de vida...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço muito a orientadora Antonia Maria Ramos Franco, por ter permitido meu crescimento dentro do seu grupo de pesquisa, pelo apoio e ensinamentos preciosos e pela visão “sobrenatural” que muitas vezes guiaram o estudo e as decisões a serem tomadas. Deixo aqui um muito obrigado, com um carinho especial!

Agradeço a querida pesquisadora Maricleide Farias Naiff pela paciência, pelos conselhos, pelos ensinamentos e todo apoio fornecido a toda equipe do Laboratório de Leishmaniose em todas as situações que sua intervenção é precisa e coerente.

Agradeço ao professor e co-orientador Pierre Alexandre dos Santos, novamente, pela sua preciosa ajuda, mesmo distante, pelo companheirismo e pelas valiosas discussões.

Ao professor Andriy Grafov e professora Iryna Grafova, pela possibilidade de conhecimento e pela experiência adquirida em seu laboratório em Helsinki-Finlândia.

Ao gestor do Biotério Central do INPA, Leonardo Brandão Matos, pelo auxílio durante as etapas experimentais em modelo animal.

Ao professor José Fernando Marques pela oportunidade de realizar a parceria com o Laboratório de Histopatologia e pelas análises histopatológicas realizadas, que muito contribuíram com este trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos nas disciplinas e aos pesquisadores do INPA pelos ensinamentos e ajuda.

Ao aluno Bruno Bezerra Jensen por todo o auxílio, companheirismo e idéias que foram de valiosa ajuda a realização deste trabalho.

A doutoranda Fabiane Veloso Soares, pela amizade sincera, por me ensinar muito sobre cultivo de parasitas, por me auxiliar sempre que necessário.

As recém-mestres do Laboratório Ana Flávia Chagas e Pauline Soldera pela amizade, auxílio, discussões enriquecedoras e por permitir meu aprendizado com vocês enquanto também as ensinava. A Luanda de Paula Figueira, pois mesmo o pouco tempo que convivemos no Laboratório você mostrou a perseverança frente às dificuldades. Também agradeço a Alana Vinhote, pelo aprendizado e companheirismo e por me “adotar” como sua discípula quando inicei o doutorado no Laboratório de Leishmaniose.

Aos “leishmaniacos” Francimeire Gomes Pinheiro, por ajudar a todos que precisam e sempre que precisam. Ao doutorando Pedro Rael Domingos pelas discussões e idéias inovadoras.

Aos alunos que passaram por IC no laboratório: Angela Maria Comapa Barros, Camila Silva Santos, Sebastian Domingues Soares Neto pela ajuda e companheirismo. Agradeço também aos alunos da UFAM Gabriel Oliveira e Chanderlei Tavares por todo auxílio no Laboratório de Produtos Naturais. Ao técnico Magno da Química-INPA.

Aos doutores que já trilharam os caminhos do doutorado pelo Laboratório de Leishmaniose: Thaís Tibery Espir, Liliane Coelho da Rocha, Sonia Rolim Reis e Luís Henrique Gomes, pelos conselhos.

Aos técnicos do Laboratório de Leishmaniose: Lourival Maciel Castro, Ana Cleide Farias Barreto, Roberto Dantas e Artêmio Coelho pelo auxílio e todo suporte prestados. A técnica Rose Campos, da UFAM, pela realização dos cortes histológicos.

A Dra. Aline Fagundes, por permitir a parceria e realização das técnicas moleculares.

Ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia, por todo apoio oferecido durante o curso e pela oportunidade de realização do Doutorado.

Às Instituições Universidade Federal do Amazonas e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela infraestrutura e materiais oferecidos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma protozoonose causada por parasitas do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem pela picada do inseto flebotomíneo. Na LTA, os pacientes podem apresentar a forma cutânea, com lesões localizadas na pele que podem evoluir para lesões crônicas. O tratamento de primeira escolha são antimoniais pentavalentes e os fármacos de segunda escolha são pentamidina e anfotericina B, porém todos apresentam efeitos colaterais e requerem administração parenteral. Os produtos naturais apresentam-se como uma alternativa para o tratamento de inúmeras enfermidades, e há trabalhos que demonstram potencial contra *Leishmania*. Na região Amazônica, a espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) LP Queiroz destaca-se pela sua importância econômica e farmacológica, devido à atividade anti-inflamatória e antimicrobiana relatada. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de extratos e frações de *L. ferrea* contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, realizando também a sua caracterização química, e estudar o efeito *in vivo* de formulações tópicas contendo pentamidina, os extratos e frações mais promissoras. Foram preparados extratos hexânicos e metanólicos do epicarpo, folhas e galhos de *L. ferrea*, os quais foram submetidos a bioensaios *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, pelo método da contagem direta. Os extratos mais ativos foram avaliados *in vitro* quanto a atividade citotóxica em macrófagos de linhagem J774. Os extratos e frações ativos foram analisados por CCDC, quantificados o teor de fenólicos e flavonoides, e analisados por RMN e CLAE. Os ensaios *in vivo* empregaram hamsters como modelo animal, infectados com *L. (L.) amazonensis*. Foram preparadas e avaliadas por aplicação tópica nas lesões, inicialmente, emulsões hidratantes e anidras contendo isetionato de pentamidina (10%). Os resultados dos bioensaios demonstraram que o extrato metanólico de epicarpo (EpMeOH) apresentou maior atividade frente as espécies de *Leishmania*, com EC<sub>50</sub> de 15,01 µg/mL contra *L. (L.) amazonensis*. Este extrato apresentou a maior concentração de fenólicos (5,14%). A fração 2-DCM demonstrou também atividade, com EC<sub>50</sub> 12,77 µg/mL contra *L. (L.) amazonensis*. Não foi observada atividade citotóxica em macrófagos para ambas as amostras. As emulsões hidratantes contendo pentamidina foram mais eficientes, embora fossem detectados parasitas viáveis em todos os grupos após oito dias de tratamento. Estas emulsões hidratantes foram utilizadas como base para cremes com adição de 2,5% do extrato EpMeOH e avaliados em duas áreas com lesões cutâneas - focinho e pata. Os grupos tratados com creme com extrato EpMeOH (2,5%) e o placebo mostraram diferenças quanto ao volume da lesão quando comparados ao grupo controle após 20 dias de tratamento, mas mostraram a presença de parasitas, sem diferença estatística entre o grupo controle. Estes resultados sugerem que o tempo de tratamento e a concentração do extrato devem ser aumentadas, além da proporção do uso do extrato EpMeOH em uma formulação mais hidrofílica. O hidrogel EpMeOH foi avaliado em lesões no focinho de hamsters, assim como emulsão Fr2. Após 40 dias de tratamento, os grupos tratados com estas formulações tópicas mostraram diferenças estatísticas entre o grupo controle e também entre seus respectivos placebos, quanto ao volume, aspecto clínico da lesão, e quanto à quantificação parasitária. Menor infiltrado inflamatório foi observado no grupo hidrogel EpMeOH. Este estudo permitiu identificar os extratos promissores no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental e corrobora apontando novas oportunidades e inovação servindo como base para formulações de fitoterápicos para o tratamento desta doença negligenciada.

**Palavras-Chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana; produtos naturais; extratos vegetais, tratamento tópico, bioensaios.

## ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a protozoonosis caused by parasites of the genus *Leishmania*, which is transmitted by the bite of the sand fly insect. The LTA, patients can present cutaneous form, with localized skin lesions that may progress to chronic lesions. The treatment of choice is pentavalent antimony and drugs of second choice are pentamidine and amphotericin B, but all have side effects and require parenteral administration. Natural products are presented as an alternative for the treatment of many diseases, and there are studies that demonstrate potential against *Leishmania*. In the Amazon region, *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) LP Queiroz stands out for its economic and pharmacological importance, due to anti-inflammatory and antimicrobial reported. This study aimed to evaluate the activity of extracts and fractions of *L. ferrea* against promastigotes and amastigotes of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis* also conducting its chemical characterization, and study the effect in topical formulations containing pentamidine, extracts and most promising fractions. And hexane extracts were prepared methanolic the epicarp, leaves and branches of *L. ferrea*, who underwent in vitro bioassays against promastigotes and amastigotes of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis*, the counting method direct. The most active extracts were evaluated in vitro for cytotoxic activity in J774 macrophage lineage. The extracts and active fractions were analyzed by TLC assay, the quantized flavonoid and phenolic content, and analyzed by NMR and HPLC. The *in vivo* assays employed as an animal model hamsters infected with *L. (L.) amazonensis*. They were prepared and evaluated by topical application on lesions initially hydrating and anhydrous emulsions containing pentamidine isethionate (10%). The results of the bioassays showed that the methanolic extract from epicarp (EpMeOH) showed a higher activity against species of *Leishmania*, with  $EC_{50}$  15.01  $\mu\text{g/ml}$  against *L. (L.) amazonensis*. This extract had the highest concentration of phenolic (5.14%). A 2-DCM fraction also demonstrated activity with  $EC_{50}$  12.77  $\mu\text{g/mL}$  against *L. (L.) amazonensis*. No cytotoxic activity was observed in macrophages for both samples. The moisturizing emulsions containing pentamidine were most effective, although viable parasites were detected and all groups after eight days of treatment. These moisturizing emulsions were used as a base for creams with addition of 2.5% of EpMeOH extract and evaluated in two areas with skin lesions - snout and paw. The groups treated with cream EpMeOH extract (2.5%) and placebo showed differences in lesion volume compared to the control group after 20 days of treatment, but showed the presence of parasites, with no statistical difference between the control group. These results suggest that the treatment time and extract concentration to be increased beyond the proportion of use of EpMeOH extract in a more hydrophilic formulation. The hydrogel EpMeOH was then evaluated for lesions on the snout of hamsters as well as cream Fr2. After 40 days of treatment, the groups treated with these topical formulations showed significant differences between the control group and between their respective placebos, as volume, clinical aspect of the lesion, and as the parasitic quantification. Minor inflammatory infiltrate was observed in the hydrogel EpMeOH. This study identified extracts promising in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis and supports pointing new opportunities and innovation serving as a basis for herbal formulations to treat this neglected disease.

**Keywords:** American cutaneous leishmaniasis; natural products; extratos vegetais; topical treatment, bioassays.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AcOEt** – Acetato de etila

**n-BuOH** – Butanol

**CCF** – Coluna Cromatográfica Filtrante

**CCDC** – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

**CD<sub>3</sub>OD** – Metanol deuterado

**CDCl<sub>3</sub>** – Clorofórmio deuterado

**CG-EM** – Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas

**EC<sub>50</sub>** – Concentração Efetiva para 50% dos indivíduos

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**DCM** – Diclorometano

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**IM** – Intra-muscular

**INPA** – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

**LC** – Leishmaniose Cutânea

**LCM** – Leishmaniose Cutaneomucosa

**LCD** – Leishmaniose Cutâneo-difusa

**LT** – Leishmaniose Tegumentar

**LTA** – Leishmaniose Tegumentar Americana

**MeOH** – Metanol

**MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão

**MHOM** – Mammalia *Homo sapiens*

**MO** – Microscopia Óptica

**MTT** – Sal de tetrazólio

**NNN** – Meio Novy – McNeal - Nicolle

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**R<sub>f</sub>** – Fator de retenção

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**RPMI** – meio Roswell Park Memorial Institute

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SFBi** – Soro Fetal Bovino Inativado

**SFM** – Sistema Fagocítico Mononuclear

**TMS**– Tetrametilsilano

**UFAM** – Universidade Federal do Amazonas

**UV** – Ultravioleta

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A Doença Leishmaniose.....	5
2.2 Aspectos biológicos.....	9
2.3 Aspectos patológicos e imunológicos da Leishmaniose Tegumentar .....	13
2.4 Diagnóstico da LTA .....	16
2.5 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar .....	18
2.6 Produtos naturais com atividade anti-leishmania.....	22
2.7 <i>Libidibia ferrea</i> (Fabaceae-“Caesalpinoideae”).....	26
2.8 Tratamento tópico da leishmaniose.....	29
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral .....	33
3.2 Objetivos Específicos .....	33
4. METODOLOGIA GERAL .....	35
4.3 Coleta do material vegetal de <i>Libidibia ferrea</i> .....	36
4.4 Preparação dos extratos de <i>L. ferrea</i> .....	36
4.5 Partição dos extratos.....	38
4.6 Curvas de padronização para determinação da abundância relativa de substâncias fenólicas e flavonoides .....	38
4.7 Curva de crescimento de <i>Leishmania</i> .....	38
4.8 Padrões de drogas utilizadas como controles <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	39
CAPÍTULO I.....	40
CAPÍTULO II.....	62
CAPÍTULO III .....	85
CAPÍTULO IV .....	105
CAPÍTULO V .....	126
5. DISCUSSÃO GERAL.....	159
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	162
7. PERSPECTIVAS .....	163
8. REFERÊNCIAS .....	164
9. ANEXOS.....	182

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição mundial da Leishmaniose em 2013. Fonte: OMS, ( <a href="http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html">http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html</a> ) .....	6
<b>Figura 2</b> – Formas celulares distintas de <i>Leishmania</i> . A – forma promastigotas; B – forma amastigota. Fonte: Brasil, 2007. ....	10
<b>Figura 3</b> – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp., mostrando as fases de vida no hospedeiro vertebrado (humano) e invertebrado (o vetor flebotômico). Fonte: Reithinger <i>et al</i> , 2007. ....	13
<b>Figura 4</b> – Naftoquinonas diméricas isoladas de <i>Pera benensis</i> .....	24
<b>Figura 5</b> – Imagens de <i>Libidibia ferrea</i> . ....	27
<b>Figura 6</b> – Fluxograma geral da preparação dos extratos obtidos de galho, folhas e epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i> . ....	37
<b>Figura 7</b> - Atividade anti-leishmania dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	55
<b>Figura 8</b> - Atividade anti-leishmania dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> . ....	56
<b>Figura 9</b> - Atividade anti-leishmania dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> .....	58
<b>Figura 10</b> - Atividade citotóxica dos extratos mais ativos em macrófagos de linhagem MJ774 incubados a 37° C por 48 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica (MTT) e contagem em Hemocitômetro empregando o corante vital Azul de Tripán. ....	60
<b>Figura 11</b> - – Atividade do extrato metanólico do epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i> frente a formas amastigotas interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. Espécies: <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (MHO/BR/95/M4147). ....	60
<b>Figura 12</b> – Efeito da atividade do extrato metanólico do epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i> (250 µg/mL) contra formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (MHO/BR/95/M4147). em macrófagos de linhagem J744. ....	61
<b>Figura 13</b> – Espectro <sup>1</sup> H (300 MHz) da Fração DCM da partição do Extrato Metanólico do Epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i> . ....	76

<b>Figura 14</b> Cromatograma da Fr2-DCM e massa/carga (m/z) das substâncias eluidas nas condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência .....	77
<b>Figura 15</b> Atividade anti-leishmania de frações de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584).....	78
<b>Figura 16</b> . Atividade anti-leishmania das frações de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (IFLA/BR/67/PH8). .....	79
<b>Figura 17</b> Atividade anti-leishmania das frações de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> .....	80
<b>Figura 18</b> – Atividade da Fr2-DCM frente a formas amastigotas interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. Espécies: <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (MHO/BR/95/M4147).....	82
<b>Figura 19</b> – Atividade da Fr2-DCM frente a formas amastigotas interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. Espécies: <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (MHO/BR/95/M4147).....	84
<b>Figura 20</b> – Evolução clínica do volume das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , durante e após o tratamento tópico com cremes hidratantes. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico. ....	96
<b>Figura 21</b> – Valores médios do número de amastigotas contados por campo, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com cremes hidratantes e grupo controle, coradas por Giemsa e contadas em 1000X. ....	97
<b>Figura 22</b> – Aspecto clínico macroscópico das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no oitavo dia pos- tratamento com cremes de aplicação tópica hidratantes. A – controle; B – ACE0B; C- ACE5AU; D – ACE5A.....	98
<b>Figura 23</b> Micrografia (MET) de tecido de animais experimentalmente infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> que receberam tratamento apenas com a base de fórmula ou nenhum tipo de tratamento (grupo placebo ACE0B e grupo controle). Presença de formas amastigotas. ....	98
<b>Figura 24</b> Evolução clínica do volume das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , durante e após o tratamento tópico com cremes anidros. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico. ....	100
<b>Figura 25</b> Valores médios do número percentual de amastigotas e macrófagos infectados, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com cremes anidros e grupo controle, coradas por Giemsa e contadas em 1000X.....	101
<b>Figura 26</b> Aspecto clínico macroscópico das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no décimo dia pos- tratamento com cremes de aplicação tópica anidros. A – controle; B – ECU C- ACPU; D – ACP .....	101

<b>Figura 27</b> - Microfotografia (MET) de tecido de lesão de hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Leishmania).amazonensis</i> , após 30 dias de tratamento A – grupo controle, sem tratamento. B – grupo que recebeu tratamento com formulação contendo 10% de pentamidina (ACP).....	102
<b>Figura 28</b> Evolução clínica do volume das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados na pata traseira direita com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , durante e após o tratamento tópico com emulsões tópicas. Controle: animais inoculados que não receberam tratamento .....	115
<b>Figura 29</b> - Valores médios do número percentual de formas amastigotas e macrófagos infectados contados por campo, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com emulsões e grupo controle, coradas por Giemsa e quantificados em 1000X. ....	116
<b>Figura 30</b> – Aspecto clínico macroscópico das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados na pata traseira direita por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no 10º dia após o tratamento com emulsões. A – Grupo tratado com emulsão com Extrato EpMeOH (2,5%). B – Grupo tratado com emulsão Placebo. C – Grupo infectado e não tratado.....	116
<b>Figura 31</b> - Microfotografia (MET) de tecido de lesão em patas de hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , após 26 dias de tratamento com emulsão tópica contendo 2,5% de Extrato EpMeOH. Presença de formas amastigotas no vacúolo parasitóforo. ....	117
<b>Figura 32</b> Evolução clínica do volume das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> inoculados no focinho com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , durante e após o tratamento tópico com emulsões tópicas. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico.....	119
<b>Figura 33</b> Valores médios do número percentual de formas amastigotas e macrófagos infectados contados por campo, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com emulsões e grupos controle, coradas por Giemsa e contadas em 1000X. ....	120
<b>Figura 34</b> – Aspecto clínico macroscópico das lesões cutâneas em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no 10º dia de tratamento com emulsões. A – Grupo tratado com emulsão com Extrato Metanólico do Epicarpo (EpMeOH) (2,5%). B – Grupo tratado com emulsão Placebo. C- Grupo tratado com Glucantime (IM) (20mg/kg/dia) D – Grupo infectado e não tratado.....	121
<b>Figura 35</b> - Cronograma esquemático de tratamento tópico em experimentação animal ...	133
<b>Figura 36</b> - Evolução clínica do volume das lesões de <i>Mesocricetus auratus</i> inoculados no focinho com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , durante o tratamento experimental com hidrogéis de uso tópico e Glucantime® intramuscular. Controle: animais inoculados sem tratamento .....	139
<b>Figura 37</b> – Aspecto clínico das lesões de <i>Mesocricetus auratus</i> infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> no 30º dia de tratamento experimental. A – Grupo tratado com GelEpMeOH. B – Grupo tratado com GelPla. C- Grupo tratado com Glucantime® (IM) (20 mg/kg/dia) D – Grupo infectado e não tratado. ....	140

- Figura 38** - Evolução clínica do volume das lesões de *Mesocricetus auratus* inoculados no focinho com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante o tratamento experimental com emulsões de uso tópico e Glucantime® intramuscular. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico. ....141
- Figura 39** – Aspecto clínico das lesões de *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no 30º dia de tratamento experimental. A – Grupo tratado com EmulFr2. B – Grupo tratado com EmulPla. C- Grupo tratado com Glucantime® (IM) (20 mg/kg/dia) D – Grupo infectado e não tratado. ....143
- Figura 40** – Score de parasitas viáveis visualizados em cultura Novy-McNeal-Nicolle (NNN) após oito dias de incubação a 25° C provenientes de fragmentos de lesões dos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* dos grupos experimentais. ....145
- Figura 41** – Índices da abundância relativa de amastigotas e do percentual de macrófagos infectados visualizados e estimados por microscopia óptica (1000X) nas impressões em lâminas dos tecidos oriundos dos locais de lesão de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, nos grupos experimentais. A – 40 dias de experimentação. B – 60 dias de experimentação. ....147
- Figura 42** Concentração de DNA quantificado por q-PCR de biópsias de lesões de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e que receberam diferentes tratamentos. A – 40 dias de experimentação. B – 60 dias de experimentação. ....149
- Figura 43** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não tratado. Controle (-). Dermatite perifolicular focada ao redor do istmo capilar. Dermatite perivascular moderada também observada. HE. Aumento de 112x. ....150
- Figura 44** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não tratado. Controle (-). Infiltração difusa de células inflamatórias com algumas células epiteliodes de permeio. Numerosas amastigotas em meio a infiltrado mononuclear. HE. Aumento de 160x. ....151
- Figura 45** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratado com Glucantime® (Controle +). Menor infiltração de células inflamatórias (+). Dermatite perifolicular leve e não estendendo as glândulas sebáceas. HE. Aumento de 40x. ....152
- Figura 46** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratado com Glucantime® (Controle +). Aumento de 112 x. ....152
- Figura 47** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratado com GelEpMeOH. Leve infiltração de células inflamatórias (+). ....153
- Figura 48** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania amazonensis* tratado com GelPla. Intensa e difusa infiltração de células inflamatórias (+++) na derme papilar e reticular se estendendo até folículos pilosos. HE. Aumento de 40x. ....153

**Figura 49** Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania amazonensis* e tratados com EmulFr2. Moderada infiltração de células inflamatórias (++) na derme papilar e reticular. Aumento de 40x. ....154

**Figura 50** - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania amazonensis* tratado com EmulPla. Intensa e difusa infiltração de células inflamatórias (+++). Algumas áreas granulomatosas. Presença de infiltração de células epitelioides, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. HE. Aumento de 160x .....155

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Taxa de incidência de LTA entre os anos de 2006 a 2012, nas regiões do Brasil. Fonte: Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde.....	7
<b>Tabela 2</b> – Número de casos novos de LTA por ano confirmados entre os anos de 2006 a 2012, nos estados da Região Norte.....	8
<b>Tabela 3</b> – Rendimento dos extratos de <i>Libidibia ferrea</i> .....	51
<b>Tabela 4</b> – Determinação da abundância relativa de fenólicos e flavonoides presentes nos extratos ativos de <i>Libidibia ferrea</i> .....	52
<b>Tabela 5</b> – Atividade anti-leishmania em promastigotas em seus valores calculados de CE <sub>50</sub> por regressão linear (modelo Deming) para os extratos de epicarpo, folhas e galhos de <i>Libidibia ferrea</i> .....	54
<b>Tabela 6</b> – Atividade citotóxica em macrófagos J774 e o IS calculado para para os extratos mais promissores <i>Libidibia ferrea</i> quando avaliados contra as formas promastigotas de <i>Leishmania. (Leishmania) amazonensis e Leishmania. (Viannia) guyanensis.</i> .....	59
<b>Tabela 7</b> – Rendimento dos das frações obtidas da partição do extrato metanólico do epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i> .....	74
<b>Tabela 8</b> – Determinação da abundância relativa de fenólicos e flavonoides presentes nas frações de <i>Libidibia ferrea</i> .....	75
<b>Tabela 9</b> – Valores de EC <sub>50</sub> calculados por regressão linear modelo Deming para as formas promastigotas das espécies avaliadas na presença das frações do EpMeOH de <i>Libidibia ferrea</i> e para os padrões de flavonoides e do fármaco Pentamidina. ....	83

## 1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, sendo causadas por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, e que possuem a capacidade de invadir e reproduzir-se dentro das células que fazem parte do sistema imunológico do hospedeiro infectado (Gontijo e Carvalho, 2003; Brasil, 2010; Pace, 2014). Os parasitos possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estágios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados, sendo transmitidos ao homem durante o repasto sanguíneo do vetor invertebrado (Murray *et al*, 2005; Bates, 2007). As enfermidades causadas por parasitas do gênero *Leishmania* compreendem duas principais formas: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT) (OMS, 2010).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 98 países (Alvar *et al.*, 2012), distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de dois milhões de novos casos registrados por ano e mais de 15 milhões de pessoas infectadas no Mundo, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas (OMS, 2012). Em 2011 foram notificados mais de 57.000 casos da leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas, sendo no Brasil a maior concentração de casos, cerca de 40% (PAHO, 2013). É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (OMS, 2012).

No continente americano as formas clínicas da LT são conhecidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) [Gontijo e Carvalho, 2003; Rey, 2010]. A LTA apresenta-se sob três formas clínicas dependendo da espécie do parasito e, conseqüentemente, da resposta imunológica do hospedeiro: a leishmaniose cutânea - LC, a leishmaniose cutaneomucosa - LCM e a leishmaniose cutânea difusa – LCD (PAHO, 2013).

No Brasil, foram identificadas as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* como as causadoras de LTA (Lainson e Shaw, 1987; Gontijo e Carvalho, 2003; Genaro e Reis, 2005; Guizani *et al.*, 2011).

Apesar de haver registro de casos de LTA em todas as regiões do país, as regiões Norte e Nordeste são as que apresentam maior percentual de casos nos últimos anos. A média de casos notificados entre 1991 e 2010 foi de 27.374 ao ano, concentrando o maior número na região Norte (36,4%) (Brasil, 2013). Relatos de surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização.

Os tratamentos de primeira escolha para muitas formas de LTA são injeções diárias de antimoniais pentavalentes (Berman, 2005; Brasil, 2007), como o antimoniato de N-metilgucamina (Glucantime) e o estibogluconoato de Sódio (Pentostan) [Tiuman *et al.*, 2011]. Drogas como isetionato de pentamidina, miltefosina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal, constituem opções terapêuticas aos casos de baixa eficiência dos tratamentos (Berman, 1988; OMS, 2012).

Os fármacos conhecidos e utilizados para o tratamento de leishmanioses tegumentares apresentam uma série de problemas, que incluem resistência do parasito e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia. Além disso, todos os fármacos que estão disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente e muitos abandonam o tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Silva-Lopez, 2010).

As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento com os fármacos mais utilizados para as leishmanioses, como os antimoniais pentavalentes, paralelamente aos

seus efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores a buscar novas substâncias com ação contra *Leishmania*, assim como também formas farmacêuticas que possuam maior facilidade de administração e menores efeitos colaterais.

Por muitos anos o uso tradicional dos produtos naturais foi focado nos medicamentos tradicionais e em venenos naturais. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos tradicionais foram derivados predominantemente de plantas, que constituíram a base da maioria dos primeiros medicamentos, como aspirina, digitoxina, morfina, quinina, e pilocarpina (Grabley e Thiericke, 2000; Newman, *et al* 2000; Busset *al.* 2003).

Grande parcela da população, sem acesso a medicamentos, busca alternativas na medicina popular, com a utilização terapêutica das plantas. As plantas fornecem uma incomparável diversidade química e de bioatividade (Barreiro e Bolzani, 2009) as quais tem permitido o desenvolvimento de centenas de produtos farmacêuticos (Oliveira, Gilbert, Villas-Boas, 2013). As plantas possuem a capacidade de produção de uma diversidade de metabólitos secundários com atividades biológicas de grande interesse na sociedade humana. Até o final do século XX, estudos estimaram que cerca de 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, utilizou os produtos naturais como fonte primária nos tratamentos de doenças (Núñez-Sellés *et al.*, 2007).

Ao contrário dos medicamentos convencionais, os fitoterápicos são misturas de constituintes, ao menos em parte delas, sem caracterização química, e por serem constituídos por uma mistura fornecem vantagem terapêutica, pois os componentes desconhecidos podem combinar entre si e com aqueles já determinados de maneira sinérgica resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido puro (OMS, 2008).

Entre os biomas brasileiros, a Floresta Amazônica destaca-se no fator biodiversidade. A grande diversidade de plantas constitui uma fonte muito rica para o estudo de produtos naturais ativos, principalmente na busca de alternativas no tratamento e doenças

negligenciadas, tal como é a Leishmaniose. A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea*, nativa da região Amazônica, apresenta ampla distribuição, propriedades econômicas e também farmacológicas, sendo empregada desde a produção de madeira, quanto na arborização de ruas, avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas (Lorenzi, 2002).

Estudos químicos e farmacológicos de extratos obtidos de *L. ferrea* tem demonstrado seu potencial biológico anti-inflamatório (Carvalho *et al*, 1996), bactericida (Sampaio *et al*, 2009), hipoglicemiante e antioxidante (Batubara *et al*, 2009), e também mostrou inibição do crescimento *in vitro* de *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010).

Assim, faz-se necessário o prosseguimento dos estudos com extratos obtidos deste vegetal, visando, além da obtenção de frações ativas contra o parasita, a caracterização química deste material e sua atividade biológica *in vivo*. Estes estudos permitem um maior embasamento experimental para desenvolver e estabelecer um possível novo tratamento para a população acometida pela doença.

Pretende-se com este estudo contribuir para a obtenção de formulações com base fitoterápica, utilizando extratos ou frações de *L. ferrea*, ou mesmo de um fármaco que possa ser indicado por apresentar potencial atividade no combate a esta importante doença negligenciada, principalmente no Brasil.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Doença Leishmaniose

As leishmanioses, protozoonoses heteroxênicas, apresentam alta prevalência em regiões de climas tropical e subtropical do Velho e Novo Mundo (Paiva *et al*, 2007). As Leishmanioses são importantes em termos de morbidade e algumas são severas em termos de mortalidade (Pinheiro, 2004). No homem, a doença ocorre em quatro formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral (Berman, 1997; Murray *et al*, 2005). Estas formas apresentam uma grande dicotomia em relação à gravidade: desde uma úlcera cutânea, em que o paciente pode curar-se espontaneamente, até a forma mais grave das leishmanioses, a forma visceral, que pode levar o paciente a morte quando não tratado (OMS, 2012).

Na LTA, os pacientes podem apresentar a forma cutânea, que é caracterizada por lesões localizadas na pele, que pode curar-se espontaneamente ou evoluir para lesões crônicas, com cicatrizes desfigurantes. A forma mucocutânea manifesta-se com lesões ulcerativas e destrutivas das mucosas e a cutânea difusa caracteriza-se por lesões nodulares não ulcerativas e disseminadas (Maekelt, 1972; Brasil, 2007, Hartley *et al*, 2014).

As formas da leishmaniose são registradas nos continentes asiáticos, europeu, africano, e nas Américas, exceto na Oceania (Follador, 1999; Vieira *et al*, 2007; Alvar *et al*, 2012), conforme apresentado na figura 01. A Leishmaniose Tegumentar apesar de amplamente distribuída, concentra 1/3 de sua ocorrência em três regiões epidemiológicas: as Américas, o Mediterrâneo e a região oeste até o leste próximo da Ásia Central (Alvar, *et. al*, 2012).

As maiores ocorrências da doença são observadas nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a disseminação está associada com as mudanças sócio-econômicas comportamentais como, por exemplo, êxodo rural, desemprego, guerra, etc., tornando cada vez mais difícil a implantação dos programas de controle (Lainson e Shaw, 1987; Iesus, 1999; OMS, 2012). Os dez países com maior número de casos registrados são o Afeganistão, Algéria, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (figura 01), que juntos totalizam 70 a 75% da incidência global de LT (Alvar *et al.*, 2012).



Figura 1 – Distribuição mundial da Leishmaniose em 2013. Fonte: OMS, ([http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html))

O Brasil encontra-se entre os cinco países com o maior número de casos desta endemia que representa um grave problema de saúde pública, com destaque para a região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Costa, 2005) e, apresenta um importante incremento de casos com duplo perfil epidemiológico observado, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles e, ainda, pelo aparecimento de surtos epidemiológicos associados especialmente a acelerado processo de expansão das fronteiras agrícolas, a implantação de áreas de garimpos, a construção de rodovias e invasões na periferia das cidades (FVS, 2007). A interação do homem com o meio ambiente é muitas vezes determinante na rede de causalidades múltipla dessa doença (Grimaldi, *et al.*, 1989).

No período de 2007 a 2012 a LTA apresentou uma média anual de 21.672 casos novos no país, com o coeficiente de detecção de 11,7 casos por 100.000 habitantes em 2012 (SINAN, 2012). As regiões com maior número de casos novos são a região Norte e Nordeste, apresentando 9.983 e 8.124 respectivamente, em 2012. Os coeficientes médios mais elevados foram registrados na região Norte (61,02/100.000 habitantes), seguidos das regiões Centro-Oeste (21,65/100.000 habitantes) e Nordeste (15,07/100.000 habitantes), conforme apresentado na tabela 01.

Tabela 1 Taxa de incidência de LTA entre os anos de 2006 a 2012, nas regiões do Brasil.

Fonte: Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde.

<b>Região</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>Total</b>
<b>TOTAL</b>	<b>11,58</b>	<b>11,46</b>	<b>10,64</b>	<b>11,38</b>	<b>11,59</b>	<b>11,08</b>	<b>11,86</b>	<b>11,37</b>
<b>Região Norte</b>	57,71	64,94	57,23	53,63	45,18	53,51	61,07	56,15
<b>Região Nordeste</b>	11,63	11,59	11,65	12,94	17,03	14,83	15,07	13,55
<b>Região Sudeste</b>	3,42	2,47	2,06	2,02	3,15	2,65	1,65	2,49
<b>Região Sul</b>	2,05	1,94	2,39	1,60	0,91	1,21	1,54	1,66
<b>Região Centro-Oeste</b>	27,62	23,32	22,04	32,60	22,18	16,01	21,65	23,57

No Estado do Amazonas, a incidência da leishmaniose vem aumentando significativamente (tabela 02), acompanhando a abertura de novas estradas e a instalação de novos núcleos residenciais em áreas onde, previamente, existia densa floresta tropical, os treinamentos militares, na selva, também, são fatores importantes a serem considerados na epidemiologia da leishmaniose (Talhari *et al.*, 1988; Pinheiro, 2008).

Entre os estados da Região Norte, o Amazonas possui a segunda colocação em número de casos notificados de LTA, ficando atrás apenas do estado do Pará (tabela 02).

Tabela 2 – Número de casos novos de LTA por ano confirmados entre os anos de 2006 a 2012, nos estados da Região Norte.

<b>UF</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>Total</b>
<b>TOTAL</b>	<b>8.669</b>	<b>9.964</b>	<b>8.666</b>	<b>8.237</b>	<b>7.168</b>	<b>8.612</b>	<b>9.983</b>	<b>61.299</b>
<b>Rondônia</b>	1.171	984	952	1.028	937	687	1.129	6.888
<b>Acre</b>	1.089	904	959	907	1.038	872	1.095	6.864
<b>Amazonas</b>	1.534	2.216	1.793	1.434	1.131	2.278	2.250	12.636
<b>Roraima</b>	278	340	343	451	631	222	447	2.712
<b>Pará</b>	3.508	4.370	3.597	3.273	2.412	3.618	3.921	24.699
<b>Amapá</b>	594	662	630	516	457	533	699	4.091
<b>Tocantins</b>	495	488	392	628	562	402	442	3.40

Fonte: Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde (2013).

No estado do Amazonas, o município de Manaus registra o maior número de casos, seguido do município de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva. Em 2010, foram notificados 390 casos de LTA em Manaus, 130 em Presidente Figueiredo e 77 em Rio Preto da Eva (FVS, 2012).

Apesar da ampla distribuição e número de pessoas infectadas anualmente, a Leishmaniose Tegumentar vem sendo atualmente considerada uma doença negligenciada, uma vez que ocorre principalmente em regiões consideradas subdesenvolvidas e acomete populações com baixo nível socioeconômico, sendo então uma doença pouco atraente para a indústria farmacêutica (Guizani, 2011).

## 2.2 Aspectos biológicos

Os parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), são protozoários digenéticos (heteroxenos), que tem o seu ciclo biológico desenvolvido em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Possuem a seguinte posição sistemática (Levine *et al*, 1980):

Reino: Protista Haeckel, 1866

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817

Filo: Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: Mastigophora Desing, 1866

Classe: Zoomastigophora Calkins, 1909

Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-ordem: Trypanosomatida Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901, emend. Grobden, 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Esses parasitos apresentam duas formas evolutivas distintas (Lainson e Shaw, 1979; Murray *et al*, 2005): i) *Forma amastigota*: de forma arredondada ou oval com 2 a 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com um núcleo esférico e compacto, sem flagelo livre (figura 2 B). Esta forma é intracelular, multiplicando-se nos macrófagos da pele em vísceras dos hospedeiros vertebrados; ii) *Forma promastigota*: é fusiforme, com 16 a 18  $\mu\text{m}$  de longitude e é flagelada (figura 2 A). Esta forma encontra-se no tubo digestivo do flebotômico transmissor e também pode ser observada em meio de cultura.

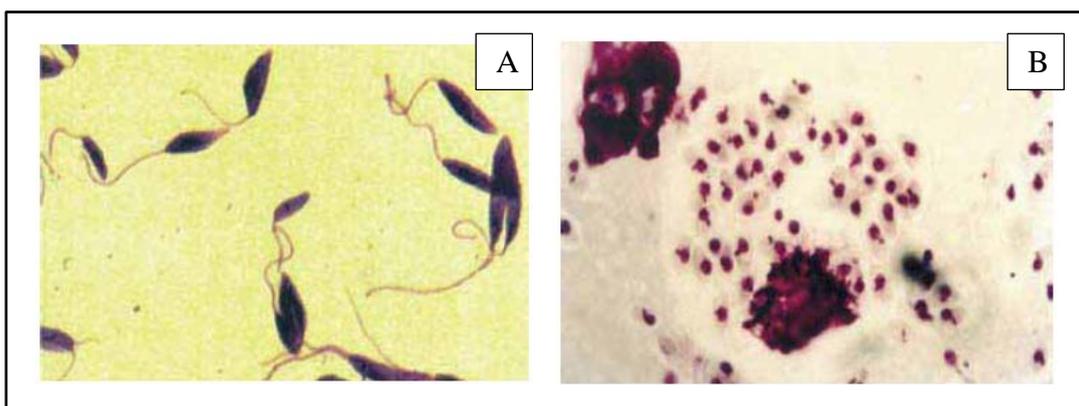


Figura 2 – Formas celulares distintas de *Leishmania*. A – forma promastigotas; B – forma amastigota. Fonte: Brasil, 2007.

São conhecidas em torno de vinte espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem e causar quadros distintos da doença (Grimaldi, *et al.*, 1989), dependendo das características de virulência da espécie, da resposta imune do hospedeiro, de fatores genéticos e da associação com outras doenças (Schriefer, *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005).

No Brasil sete espécies que causam a leishmaniose circulam: *L. (L.) amazonensis*, nas regiões norte e nordeste, *L. (V.) guyanensis*, na região norte, *L. (V.) braziliensis* da região norte até o sul, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni* na região norte, e, finalmente *L. (L.) infantum* no norte, nordeste e parte do sudeste do país (Castro *et al.* 2002; Gontijo e Carvalho, 2003).

No ciclo natural da doença zoonótica, os parasitas circulam naturalmente entre animais silvestres. O homem se infecta quando penetra neste ambiente e provoca um desequilíbrio na relação entre o parasita e seus hospedeiros naturais. A doença é transmitida através dos vetores infectados entre reservatórios silvestres e domésticos, sendo o homem um hospedeiro acidental (Reithinger *et al.*, 2007; Lima, 2010).

A maioria das leishmanioses são zoonoses e várias espécies de mamíferos são consideradas reservatórios que podem manter, por longos períodos, a *Leishmania* circulando

na natureza (Asford, 1996). Os reservatórios podem ser mamíferos domésticos ou silvestres, ou mesmo humanos. Infecções por leishmanias que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Marzochi e Marzochi, 1994). São numerosos os registros de infecção em animais domésticos, porém são considerados hospedeiros acidentais da doença (Brasil, 2010).

O agente etiológico *Leishmania* é transmitido para o vertebrado através da picada de fêmeas hematófagas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos, sendo os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* distribuídos no Novo e no Velho Mundo, respectivamente (Lima *et al*, 2010).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei*. Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetores por atenderem aos critérios que atribuem a competência vetorial a uma espécie (Pinheiro *et al*, 2010).

O ciclo de vida envolve estágios no hospedeiro vertebrado e no inseto (figura 3). No intestino dos insetos vetores, as formas promastigotas passam por um processo denominado metaciclogênese, pelo qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas) (Poinar, 2007). As formas reprodutivas, não infectantes (procíclicas), prendem-se à parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo (Ramalho-Ortigão, Saraiva, Traub-Cseko, 2010). Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são

transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo (Lainson e Shaw, 1987; Gontijo *et al*, 2010).

As mudanças bioquímicas ocorridas durante a metaciclogênese conferem as promastigotas uma resistência aumentada à lise pelo complemento. Substâncias presentes na saliva dos flebotomíneos também favorecem a infecção (Ramalho-Ortigão, Saraiva, Traub-Cseko, 2010)

Algumas das formas promastigotas infectantes, que conseguiram escapar da ação lítica do complemento e dos eosinófilos e neutrófilos, são fagocitadas por macrófagos, nos quais, transformam-se em formas amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos dessas células (Silveira *et al*, 2008). Dentro dos macrófagos passam a multiplicar-se por divisão binária.

A evolução da infecção dependerá do perfil imunológico e genético do hospedeiro, associado à resposta imune celular, e características da espécie de *Leishmania* infectante. (Sacks e Kamhawi, 2001). Nos macrófagos, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), que os separa do citoplasma celular. O parasita consegue sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplica-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (Charret *et al* 2013).

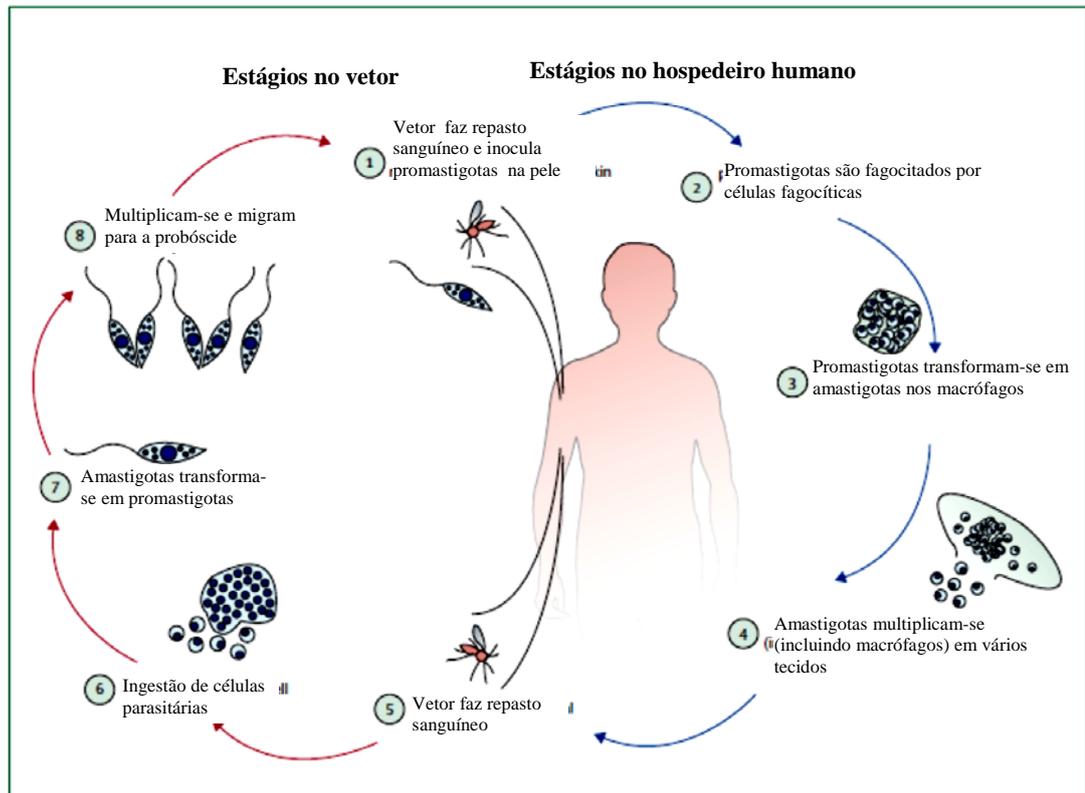


Figura 3 – Ciclo biológico de *Leishmania* sp., mostrando as fases de vida no hospedeiro vertebrado (humano) e invertebrado (o vetor flebotomíneo). Adaptado de: Reithinger *et al*, 2007.

### 2.3 Aspectos patológicos e imunológicos da Leishmaniose Tegumentar

Quando os promastigotas de *Leishmania* são pela primeira vez introduzidos na pele humana, o parasitismo induz a proliferação das células histiocitárias e a fagocitose dos flagelados por esses macrófagos teciduais que, além de não conseguirem destruir os parasitas, ainda permitem sua multiplicação no interior dos vacúolos digestivos (Sacks e Kamhawi, 2001).

Além da conhecida ação dos macrófagos, neutrófilos podem atuar como “Cavalos de Tróia” para ajudar promastigotas para alcançar sua multiplicação. Estudos com *L. major*, mostraram que promastigotas foram prontamente fagocitados pelos neutrófilos *in vitro*,

sobrevivendo dentro dos fagossomos dos neutrófilos (Kaye e Scott, 2011). Os neutrófilos infectados foram induzidos a sofrer apoptose, tornando-se uma refeição fagocítica para macrófagos que foram adicionados à cultura. Como neutrófilos apoptóticos são fagocitados por vias mediadas por receptores, suas cargas de promastigotas foram, com eficiência e segurança, transportadas para o fagossoma de macrófagos (Ravichandran e Lorenz, 2007).

Microscopicamente, é possível observar que as lesões, independentemente da espécie de *Leishmania*, ocorrem seguindo sempre uma mesma ordem, passando pelas mesmas etapas, sendo que a maior variação é o tempo e a intensidade do processo. Há, inicialmente, o aparecimento de um infiltrado denso de células mononucleadas que ocupa a parte profunda da derme e toda a espessura da hipoderme (Carvalho *et al*, 1994). Nesse infiltrado, surgem grupos de macrófagos contendo parasitas (amastigotas). Em seguida, esse grupo de macrófagos tornam-se confluentes e após a invasão por neutrófilos, sofrem necrose (Silveira *et al*, 1990).

Esse esquema geral de evolução da lesão da leishmaniose cutânea, no homem, apresenta variantes. Frequentemente a hiperplasia histocitária e a inflamação local causam a necrose (morte celular) da epiderme e das camadas subjacentes, na área parasitada, em vista das perturbações mecânicas e tróficas decorrentes desse crescimento patológico (Moraes e Silveira, 1994; Saldanha *et al*, 2012). A persistência de macrófagos com amastigotas pode ocorrer por vários meses, além de um denso infiltrado inflamatório com grupos de histiócitos nas infecções causadas por *L. (L.) amazonensis* (Moraes e Silveira, 1994).

Na leishmaniose cutânea difusa, instala-se uma hipertrofia e uma hiperplasia do sistema fagocitário mononuclear, que passa a ocupar extensas áreas cutâneas, insinuando-se entre os demais elementos histológicos e ganhando progressivamente novos espaços. Alguns autores consideram estas lesões como verdadeiros tumores (histiocitomas). Nelas o citoplasma dos macrófagos fica abarrotado de leishmanias. Este quadro clínico pode ser

observado em infecções causadas por *L. amazonensis* na forma anérgica (Rey, 2010; Charret *et al*, 2013)

As lesões causadas por *L. guyanensis* geralmente são semelhantes à espúndia, porém as úlceras são menores e curam-se espontaneamente. Pode haver uma só úlcera crateriforme ou várias, aparecendo preferencialmente nos membros superiores e inferiores. Observou-se que pode ocorrer metástases ao longo dos trajetos linfáticos, sob a forma de nódulos subcutâneos (Rey, 2010).

Os amastigotas multiplicam-se livremente no compartimento ácido dos fagolisossomas e escapam dos sistemas de defesa do hospedeiro (Frezard *et al*. 2005). A interação macrófago-promastigota é um fenômeno mediado primariamente pela protease gp63, lipofosfoglicano, além receptores como manose-fucose, receptor de complemento (CR1 e CR3) e receptor Fc (Tanaka *et al*, 2007).

Investigações *in vivo* e *in vitro* sugerem que os sistemas de defesa para a infecção por *Leishmania* envolvem a destruição dos parasitas em sua localização intracelular, resultando na ativação de macrófagos por citocinas derivadas de células T (Esterre *et al*, 1992). O aumento na atividade do macrófago envolve diferentes processos como produção de citocina (interferon alfa e beta) e atividade oxidativa, com produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (Giorgio, 1998). Na leishmaniose ocorre diminuição da resposta imune celular específica devido, em parte, à queda do número de linfócitos T do tipo CD4+, responsável pela patogênese e progressão da doença (Figueiredo, 2009).

Os macrófagos são ativados para um estado leishmanicida guiados pela resposta Th1, envolvendo apresentação de antígenos pelas células dendríticas, com resposta pelas células T CD4+ e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 12, interferon  $\gamma$  e fator de necrose tumoral (Murray *et al*, 2005). As infecções não controladas pela resposta imune celular podem evoluir para um dos pólos imunológicos: i) para o pólo de hiperreatividade,

caracterizado por forte hipersensibilidade e representado pelas formas LCM (leishmaniose cutâneo-mucosa) ou LM (leishmaniose mucosa), nas quais, a necrose do tecido mucoso é a principal manifestação do estado de hipersensibilidade dessas formas; ou ii) para o pólo de hiporreatividade, caracterizado por inibição parcial ou total da hipersensibilidade e representado pela forma LCAD (leishmaniose cutânea anérgica difusa), na qual, a grande disseminação das lesões nodulares na pele demonstra a fragilidade da resposta imune celular em controlar a infecção (Silveira *et al*, 2008).

Embora muitos fatores contribuíssem para a sobrevivência dos parasitas *Leishmania* no fagossomo, o acesso ao ferro tem um papel central, uma vez que os amastigotas podem usar a forma ferrosa ferro ( $Fe^{2+}$ ), bem como a hemina (o produto da oxidação de  $Fe^{3+}$  de heme) e hemoglobina (Carvalho *et al*, 2009). Receptores NRAMP1 codificam bombas de efluxo fagossomal, translocando  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  no citosol, e, portando, limitam a disponibilidade de ferro ao parasita (Blackwell *et al*, 2001). Como medida preventiva, *L. amazonensis* regula positivamente a expressão do seu próprio transportador de ferro, Lit1, após a sua entrada em macrófagos, e estudos recentes com *L. donovani* sugerem que a competição de ferro no interior do fagossomo pode ativar os sensores de ferro citosólicos (IRP1 e IRP2) levando ao aumento da produção de transferrina no macrófago (Kaye e Scott, 2011).

## **2.4 Diagnóstico da LTA**

O diagnóstico clínico da LTA baseia-se na maioria dos casos nas características das lesões juntamente com o processo da anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. As formas tegumentares do Novo Mundo apresentam-se como síndromes as quais as manifestações clínicas dependem de vários fatores, como a espécie de

*Leishmania* envolvida e a relação do parasita com seu hospedeiro (Gontijo e Carvalho, 2003).

A leishmaniose cutânea (LC) é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença (Bailey e Lockwood, 2007). A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões. Surge após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo.

O diagnóstico de certeza somente se obtém pela demonstração do parasita, que pode ser conseguida através de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e indireta. O exame mais simples, e por essa razão geralmente o primeiro a ser realizado, é a pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda, corado pelo Giemsa ou Leishman (Gontijo e Carvalho, 2003). Os parasitas crescem relativamente bem em diversos meios de cultura à temperatura ambiente (24-26 °C) e o meio mais empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN, e suas modificações (Ramirez, Adugelo, Muskus, 2000).

A inoculação em animais de laboratório, de preferência hamster (*Mesocricetus auratus*), nas patas posteriores ou focinho, é uma outra forma de diagnosticar a leishmaniose tegumentar. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal e a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (Gontijo e Cravalho, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction) - PCR é um exame que permite amplificar em escala exponencial seqüências de DNA. Dotada de alta sensibilidade, é capaz de detectar quantidades relativamente baixas de DNA do parasita.

Entretanto, as exigências técnicas e o custo relativamente elevado ainda limitam seu emprego rotineiro (Murray *et al*, 2005).

A intradermo reação de Montenegro (IDRM) detecta a presença de hipersensibilidade tardia uma vez que, imunologicamente, a LTA se caracteriza pelo aparecimento de uma resposta celular durante a doença e após a cura da infecção, seja de forma espontânea ou após tratamento (Goto *et al*, 2010). A técnica consiste na injeção na face flexora do antebraço de 0,1 ml de antígeno padronizado com a concentração de 40 mg de nitrogênio protéico por ml. A reação é considerada positiva quando, na leitura de 48 ou 72 horas, detecta-se endureção igual ou superior a 5 mm. O teste se torna positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea (Gontijo e Carvalho, 2003;Nogueira *et al*, 2008).

Dentre os métodos sorológicos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o mais utilizado. É uma técnica sensível, porém com possibilidade de reações cruzadas especialmente com a doença de Chagas e calazar. A RIFI apresenta resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes (Gontijo e Carvalho, 2003).

## **2.5 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar**

O tratamento da LT com antimoniais foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (antimônio trivalente – Sb<sub>3</sub>), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), obtendo algum sucesso, visto que naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento (Lainson e Shaw, 1978; Soares-Bezerra, Leon, Genestra, 2004). No entanto, esta formulação apresentava toxicidade, ocasionando tosse, dor no peito e depressão. Além disso, era de difícil administração.

Em 1937, Smith introduziu o estibogluconato de sódio (Pentostan®), um medicamento derivado do ácido estibônico, em que o antimônio está na forma pentavalente, Sb5+. Desta forma, houve redução de alguns efeitos colaterais e da toxicidade em relação ao tártaro emético. O ácido estibônico complexado a carboidratos (duas moléculas de ácido glicônico) é utilizado para o tratamento das leishmanioses em países de língua inglesa (Rath, 2003). Em países de língua francesa, espanhola e no Brasil, o fármaco utilizado é o antimoniato de meglumina, também um antimonial pentavalente (Glucantime®) [Berman, 2005]. No Brasil, a única formulação disponível é o 14 antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2007). A Organização Mundial de Saúde (2012), recomenda o tratamento de LTA com antimonial pentavalente por via endovenosa ou intramuscular, com a dose recomendada de 20 mg/kg por dia, com tratamento durante 28 dias.

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes continua pouco compreendido, mas parece que esses compostos atuam sobre diversas vias do metabolismo do parasita (Soares-Bezerra, Leon, Genestra, 2004). Tem sido sugerido que algumas particularidades químicas na composição destes fármacos podem contribuir para seus efeitos farmacológicos.

Os compostos antimoniais, por serem pouco absorvidos no epitélio gastrointestinal e irritantes para esse sistema, são administrados parenteralmente. Estudos indicam que os antimoniais trivalentes inibem a fosfofrutoquinase, inibindo dessa forma a conversão de frutose-6-fosfato a frutose 1,6-difosfato nas vias glicolíticas. Sua ação ocorre tanto nas células do parasita, quanto nas células dos mamíferos, porém a enzima fosfofrutoquinase dos mamíferos é cerca de 80 vezes menos sensível que a do parasita, permitindo que o antimonial exerça seus efeitos de modo seletivo (Balana-Fouce *et al*, 1998; Juliano, 2004).

Em geral, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados, mas alguns efeitos colaterais podem ocorrer como dor no local da injeção, disfunção gastrintestinal, dores

musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias e pancreatite (Gasser *et al.*, 1994;Oliveira *et al* 2011). A elevação das transaminases hepáticas também foi observada, mas de maneira reversível, cessando com o fim do tratamento (Tracy e Webster-Junior, 1996; Oliveira *et al* 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2012), outros efeitos observados no tratamento com antimoniais pentavalentes são mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, tremores, diarreia, febre, urticária, exantema, inflamação das veias, rigidez nas articulações, prurido, tosse, leucopenia, trombocitopenia, icterícia, albuminúria, e pneumonia.

A Anfotericina B, antibiótico macrolídeo poliênico de reconhecida ação leishmanicida, é a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso (Berman, 1986; Brasil, 2007). Foram desenvolvidas formulações lipossomais de Anfotericina B que têm diminuído seus efeitos colaterais. Sua ação baseia-se na interação com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando a morte da célula (Tiuman *et al*, 2011).

É contra-indicada a administração da anfotericina B em cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (Reithinger *et al* 2007; Neves *et al*, 2011). Os efeitos adversos mais frequentes são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão.

Uma formulação da anfotericina B à base de lipossomas (AmBisome®), depois de testes clínicos bem sucedidos, chegou a ser aprovada pela FDA (“Food and Drug Administration”) para o tratamento do calazar (Tiumann *et al*, 2011).

As pentamidinas são diamidinas aromáticas que vêm sendo utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da LT em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano (Basselin *et al.*, 1997). São comercializadas para uso em humanos nas seguintes formulações: Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-

Hidroximetil-Sulfonato). A descoberta da atividade antiprotozoária das diamidinas foi consequente a procura por compostos hipoglicemiantes que pudessem comprometer o metabolismo energético de parasitas. Atualmente, e comercializada para uso humano apenas sob a forma liofilizada de isotionato de pentamidina, em frascos contendo 300 mg do sal. O mecanismo de ação da pentamidina ocorre por inibição de diferentes processos celulares, ainda não totalmente elucidados. O isotionato de pentamidina é completamente absorvido após a administração parenteral (Moskowitz & Kurban, 1999).

A Azitromicina é o primeiro antibiótico da subclasse dos macrolídeos, conhecida como azalídeos, um conhecido antibiótico, foi avaliada clinicamente em 20 pacientes com LTA, mostrando uma taxa de cura de 85% e testes em hamster também indicaram que a azitromicina foi ativa contra *L. (V.) braziliensis* (Sinagra, 2007). Entretanto, um estudo clínico realizado em Manaus, demonstrou baixa eficiência no tratamento de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, a espécie de maior predominância na região (Teixeira *et al*, 2007).

A paromomicina é um antibiótico que age inibindo a atividade mitocondrial da célula de diferentes espécies de *Leishmania*. Por via parenteral tem mostrado eficácia tanto isolado quanto combinado ao Sb<sup>5</sup> para leishmaniose visceral. Na Índia e no Quênia teve resultado promissor com cura de 90% para leishmaniose visceral na dose de 15 mg/kg/dia durante 20 dias, incluindo casos refratários ao Sb<sup>5</sup>. Porém, apresenta ototoxicidade e nefrotoxicidade (Lima *et al*, 2007).

Outras drogas vêm sendo recomendadas no tratamento da LTA, como o alopurinol. Utilizado para prevenir altos índices de ácido úrico, apresenta menos efeitos colaterais que as drogas comumente utilizadas (Berman, 2005).

A miltefosina, uma droga utilizada inicialmente para o tratamento de câncer, também têm demonstrado eficiência no tratamento das Leishmanioses, dependendo muitas vezes das espécies causadoras (Soto *et al*, 2001).

Os fármacos conhecidos e utilizados para o tratamento de leishmanioses tegumentares apresentam uma série de problemas, que incluem resistência do parasita e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia. Além disso, todos os fármacos que estão disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente e, que infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Silva-Lopez, 2010).

## **2.6 Produtos naturais com atividade anti-leishmania**

Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos para *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas.

Por muitos anos, o uso tradicional dos produtos naturais foi focado nos medicamentos tradicionais e em venenos naturais. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos tradicionais foram derivados predominantemente de plantas, que constituíram a base da maioria dos primeiros medicamentos, como aspirina, digitoxina, morfina, quinina, e pilocarpina (Sneader, 1996; Grabley e Thiericke, 2000; Newman, *et al* 2000; Busset *al.* 2003).

Produtos fitoquímicos ou produtos naturais podem fornecer uma diversidade de substâncias com aplicações em diversos setores econômicos. Muitos destes produtos naturais possuem alto valor agregado e seus componentes químicos são frequentemente utilizados em alimentos, cosméticos, farmacêuticos e outros produtos (Harjo e Kibowo,

2004). De maneira geral, os componentes fitoquímicos consistem em misturas de pequenas moléculas em uma matriz sólida, e os consumidores em geral têm preferido produtos que contenham ingredientes naturais ao invés de produtos sintéticos, os quais são percebidos como mais seguros e saudáveis pela população (Rauter *et al.*, 2002).

Um dos importantes métodos de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos se baseia na busca de novos protótipos farmacêuticos encontrados principalmente em produtos de origem natural (Ganesan, 2002). O estudo biomonitorado permite um isolamento mais rápido e eficaz do composto ativo, podendo-se ainda, introduzir modificações químicas nestes protótipos naturais com o objetivo de amplificar sua atividade específica ou mesmo reduzir seu efeito tóxico (Peck *et al.*, 1992).

No Brasil, pesquisas voltadas para a descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitoterápicos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, se levarmos em conta que a diversidade de metabólitos produzidos nos biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada do ponto de vista farmacológico (Barreiro e Bolzani, 2009).

Segundo Lima (2001), a tendência nas pesquisas de produtos naturais, oriundos de plantas ou microrganismos, consiste na busca da obtenção de princípios ativos contidos nestas espécies, pelo fato de possuírem alto percentual de diversidade molecular, um fato essencial para a descoberta e produção de novos fármacos.

A floresta Amazônica se destaca por possuir a maior diversidade florística do mundo, porém ainda pouco estudada quanto ao seu potencial químico-farmacológico. Sendo assim, apresenta várias espécies vegetais e microbianas que podem ser portadoras de metabólitos secundários ainda não descritos, ou com potencial terapêutico não estudado contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes microbianos (Tanaka *et al.*, 2005).

Grande parcela da população, sem acesso a medicamentos, busca alternativas na medicina popular, com a utilização terapêutica das plantas. As plantas fornecem uma incomparável diversidade química e de bioatividade, no qual têm permitido o desenvolvimento de centenas de drogas farmacêuticas. Na verdade, a maioria das drogas utilizadas clinicamente para o tratamento de agentes infecciosos é derivada de produtos naturais (Barreiro e Bolzani, 2009).

A busca por produtos naturais oriundos de plantas contra a leishmaniose motivou a criação de um programa, em 1984 na Guiana Francesa, para avaliar *in vitro* e *in vivo* extratos de plantas com utilização etnofarmacológica (Rocha *et al.*, 2005).

Extratos de diferentes plantas já mostraram atividade contra espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar, como o extrato de *Piper aduncum* que apresentou valor de EC<sub>50</sub> de 24 µg/mL contra *L. amazonensis* e o extrato de *Croton cajucara* apresentou para esta espécie o valor de EC<sub>50</sub> de 8,7 µg/mL (Sen *et al.*, 2011). Já extratos de *Pera benensis* apresentou naftoquinonas diméricas (figura 4) com atividade contra *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* (Fournet *et al.*, 2002).

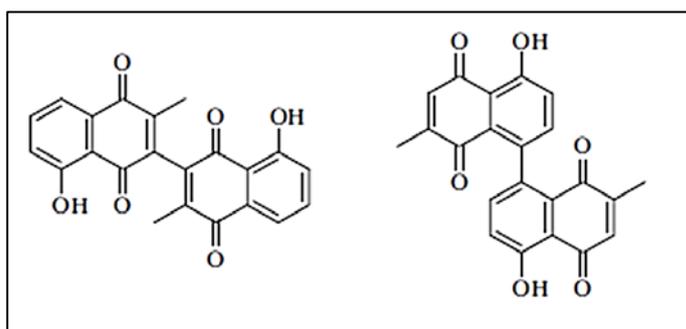


Figura 4 – Naftoquinonas diméricas isoladas de *Pera benensis* (Fournet *et al.*, 2002)

No Brasil, estudos com produtos naturais têm mostrado também o potencial de substâncias e óleos obtidos de espécies encontradas no país. Atividade leishmanicida foi detectada em benzofenonas preniladas isoladas de *Garcinia brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2010) e também em óleo de copaíba extraído de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (Santos *et al.*, 2008).

Entre as plantas que estão despertando o interesse da continuidade de estudos, *Kalanchoe pinnata* tem se destacado por apresentar flavonoides com atividade anti-leishmania (Da Silva *et al.*, 1995) e a espécie *Phyllanthus amarus* apresentou taninos e flavonoides (Herbert *et al.*, 2005).

Uma mistura de alcaloides extraídos de *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) mostrou atividade inibitória em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em sistemas *in vitro* (Rodriguez *et al.*, 2008). Alcalóides oxoaporfínicos isolados de *Annona mucosa*, assim como, extratos de folhas e sementes desta espécie também apresentaram resultados de inibição *in vitro* em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Lima, *et al.*, 2012).

Neolignanais naturais isoladas de *Virola surinamenis* mostraram atividade inibitória contra *L. (L.) donovani* (Barata *et al.*, 2000), assim como, flavonoides isolados das folhas de *Baccharis retusa* foram ativos contra espécies de *Leishmania* sp nas formas amastigotas e promastigotas (Grecco *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos, naturais ou modificados por síntese, também têm demonstrado atividade leishmanicida, como chalconas polissubstituídas que mostraram atividade contra *L. (L.) amazonensis*, *L.(V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis* (Aponte *et al.* 2010). Extratos ricos em fenólicos de *Lygodium venustum* SW. mostraram atividades inibitórias contra *L. braziliensis* nas concentrações de 500 µg/mL.

Apesar de encontrar na literatura uma diversidade de produtos naturais ou sintéticos que mostraram atividade inibitória contra *Leishmania* em sistemas *in vitro*, há pouca continuidade dos estudos para ensaios *in vivo* e clínicos para efetivamente transformar o conhecimento científico em tratamento alternativo.

## **2.7 *Libidibia ferrea* (Fabaceae-“Caesalpinoideae”)**

A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea* basônimo de *Caesalpinia ferrea* (Mart. ex Tul.) é conhecida popularmente como pau-ferro, jucá, pau-ferro-verdadeiro, jucáina e pau de jucá (Di Stasi, 1996). Pertence a família Fabaceae, considerada uma das mais importantes das famílias botânicas, distribuída em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (APGIII, 2009). Nesta família são classificadas aproximadamente 19.000 espécies em mais de 650 gêneros (Polhill *et al*, 1981; Judd *et al*, 1999; Souza e Lorenzi, 2012). No Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 2700 espécies, correspondendo à maior família em número de espécies no país (Souza e Lorenzi, 2012).

A família Fabaceae é também conhecida como Leguminosae (leguminosas) com fruto do tipo vagem. A classificação mais moderna da família Leguminosae (ou Fabaceae) a divide em três subfamílias: Papilionoideae (ou Faboideae), Caesalpinoideae e Mimosoideae (Souza e Lorenzi, 2012). Há ampla ocorrência de substâncias da classe dos flavonóides e isoflavonóides na família Fabaceae, o que pode estar associada com atividades antimicrobianas.

A distribuição de *L. ferrea* é registrada em todo o território brasileiro (Lorenzi, 2002), sendo amplamente encontrada nas regiões Norte e Nordeste. Possui flores amarelas, pequenas, em cachos, folhas compostas, folioladas e frutos legumes indeiscentes de cor

marrom escuro, tipo legume, com sementes escuras (figura 5). É uma espécie de porte arbóreo, com altura de 10 – 15 metros, e tronco curto de 40-60 cm de diâmetro.

*L. ferrea* tem sido relatada como uma fonte para uso medicinal por populações que habitam a Amazônia. As partes utilizadas no tratamento de diversas infecções são as folhas, cascas, semente, raízes, pedaços de madeira e favas (Di Staci, 1996), tornando-se promissores os ensaios de atividade biológica contra as leishmanias.

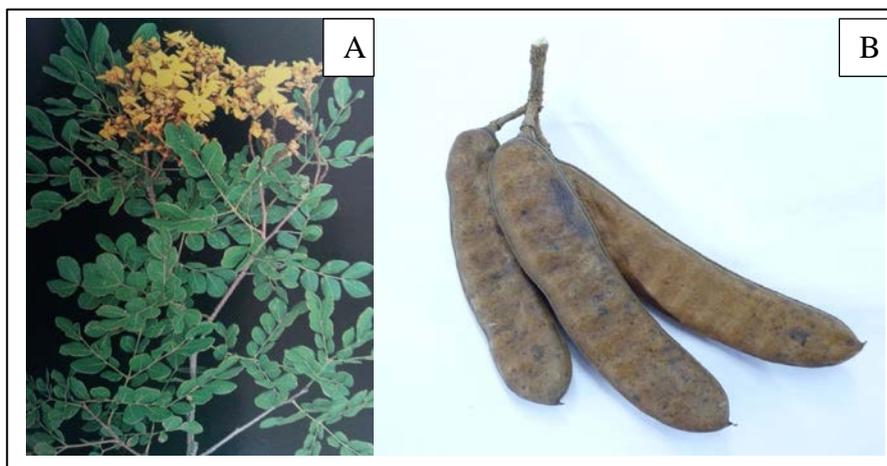


Figura 5 – Imagens de *Libidibia ferrea*. A – Ramos contendo inflorescência (Souza e Lorenzi, 2012). B- Fruto íntegro (Wyrepkowski, 2011).

Estudos químicos com esta espécie têm demonstrado que a presença de compostos fenólicos com possíveis aplicações farmacológicas, como chalconas e polifenóis (Nakamura *et al*, 2002; Nozaki *et al*, 2007).

Em um estudo com atividades biológicas de Jucá, o extrato bruto das sementes *L. ferrea* não apresentou toxicidade aguda em camundongos mesmo quando administrada a dose máxima, assim como não foram observados perda de peso, mudanças de comportamento, diarreia ou quaisquer outras alterações (Cavalheiro *et al*, 2009).

No extrato do caule de *L. ferrea*, uma baixa quantidade de taninos foi detectada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), porém os extratos apresentaram a presença de flavonoides na fração acetato de etila e terpenos nas frações diclorometano e éter de petróleo (Frasson *et al*, 2003). Do extrato do caule, foi isolada a chalcona Paufferol A (Nozaki *et al*, 2007).

Substâncias isoladas dos frutos de Jucá (*L. ferrea*) foram estudadas quanto ao seu potencial anti-tumoral em modelo *in vitro*, apresentando atividade inibitória (Nakamura *et al*, 2002). O extrato de *L. ferrea* também apresentou capacidade de inibir a degradação do DNA e atividade antioxidante elevada (da Silva *et al*, 2011).

Sua atividade no combate a complicações bioquímicas geradas em consequência da diabetes foi avaliada por Ueda *et al*. (2001), determinando a capacidade *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de frutos de *L. ferrea* de inibir a enzima aldose redutase. Foi verificado que os compostos isolados (C1 e C2) possuíam alto índice de inibição, sendo caracterizados estruturalmente como derivado do ácido elágico.

A atividade antimicrobiana dos frutos contra patógenos orais foi avaliada por Sampaio *et al* (2009), indicando que o extrato inibiu o crescimento *in vitro* de espécies como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus* sp. e *Candida albicans*. Estudos químicos deste extrato por técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) revelaram a presença de hidroxilas fenólicas e compostos metoxilados (Sampaio *et al*, 2009).

Uma atividade de extrema relevância para o tratamento das leishmanioses, a atividade cicatrizante dos frutos de jucá, foi verificada em estudos *in vivo* utilizando caprinos como modelo experimental (Oliveira *et al*, 2010), apresentando aspectos clínicos de cicatrização mais rápida que o grupo controle.

Testes *in vitro* demonstraram a atividade leishmanicida de extratos de frutos, sementes e partes dos frutos de *L. ferrea* para as espécies *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.)*

*guyanensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010). O epicarpo (estrutura mais externa da vagem) foi a parte que apresentou os melhores resultados de inibição das formas promastigotas de *Leishmania*.

A soma das atividades biológicas relatadas com os extratos de *L. ferrea*, com suas características de grande produção de frutos e ampla ocorrência na região, favoreceram a continuidade dos estudos com esta espécie de leguminosa, visando caracterizar seus constituintes químicos e aprofundar os estudos farmacológicos para sua utilização como fitoterápico auxiliar no tratamento das formas cutâneas da leishmaniose Tegumentar.

## **2.8 Tratamento tópico da leishmaniose**

O desenvolvimento de formulações tópicas seria um método alternativo para o tratamento da leishmaniose cutânea. Embora o transporte transdérmico de fármacos tenha muitas vantagens sobre outras vias de administração, este ainda apresenta problemas a serem investigados, como a baixa penetração da maioria dos compostos através da pele humana (Rossi-Bergmann, 2011; Bavasard *et al*, 2012).

As vantagens da utilização do tratamento tópico incluem evitar o metabolismo hepático de primeira passagem, impedir a exposição às condições químicas e biológicas do trato gastrointestinal, menores níveis de fármacos no plasma e o conforto do paciente na aplicação (Zanchetta, 2009; Moreno *et al*, 2015).

A estrutura da pele humana pode ser resumida como uma série de camadas penetradas por pelos e ductos de glândulas, e suas principais camadas compreendem a camada subcutânea (hipoderme), a derme com tecido conectivo e avascular estratificado e a epiderme celular. A epiderme é caracterizada por tecido epitelial de revestimento

pavimentoso estratificado queratinizado. A espessura da camada de queratina é variável conforme o atrito mecânico nas diversas regiões anatômicas (Junqueira e Carneiro, 2008).

A derme se divide em derme papilar e derme reticular. A porção papilar é representada por uma camada superficial de tecido conjuntivo frouxo, apoiando diretamente a epiderme. Possui intensa vascularização e fibras colágenas dispersas em abundante meio extracelular protéico. A derme reticular, mais profunda, é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, menos vascularizado, porém mais resistente á absorção de impactos (Junqueira e Carneiro, 2008). Em profundidade, segue-se a hipoderme, rica em tecido adiposo unilocular e fibras musculares lisas, com a mesma origem da derme (Young *et al.*, 2001)

O desafio principal para desenvolver uma terapia para a LT com formulações tópicas é a penetração do princípio ativo até as camadas mais internas da derme (Rossi-Bergmann, 2011, uma vez que o processo inflamatório crônico da leishmaniose é caracterizado por infiltrado inflamatório mononuclear, difuso nas camadas superficiais da derme e focal em torno dos vasos, folículos pilosos e glândulas submucosas (Figueiredo, 2009).

Além de atuar na inibição ou lise do parasita na sua forma intracelular de modo seletivo, sem danificar as células do hospedeiro, é importante também que a formulação estimule o processo de cicatrização da lesão. A cicatrização de lesões cutâneas é um processo biológico dinâmico bem ordenado, no qual a lesão tecidual acarreta a ruptura e o consequente extravasamento do conteúdo de vasos sanguíneos. Este processo é didaticamente dividido nas seguintes fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular (Oliveira, 2008).

Sistemas inovadores para o transporte intradérmico de medicamentos, principalmente no tratamento da leishmaniose tegumentar, vêm sendo estudados há mais de três décadas (El-On *et al.*, 1986; El-On, 1993; Krause e Kroeger, 1994; Ruiz *et al.*, 2014). Entre as

formulações disponíveis para incorporação do princípio ativos já conhecidas atualmente estão pomadas, emulsões óleo/água, hidrogéis e emulsões coloidais com nanopartículas, como lipossomas (Frezard *et al*, 2005). Os hidrogéis usados em tratamentos tópicos possuem flexibilidade similar a tecidos naturais devido ao alto conteúdo de água, o que minimiza a irritação das membranas ou dos tecidos vizinhos ao sítio de aplicação. Estes hidrogéis também podem ser aplicados como sistemas de liberação controlada de fármacos (Koop, 2012).

Estudos pioneiros com formulações tópicas aplicadas ao tratamento da leishmaniose foram realizados por El-On *et al.* (1986), utilizando preparações tópicas do antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, a paromomicina, usando 15% de sulfato de paromomicina e 12% de cloreto de metilbenzetonio em uma base hidrofóbica no tratamento de LC causada por *L. (L.) major*. Os resultados positivos encontrados neste estudo, o qual apresentou inibição parasitária após 20 dias de tratamento tópico, estimulou estudos com esta preparação em outras espécies de *Leishmania*, obtendo resultados positivos também no tratamento da LC causada por *L. braziliensis* (El-On, *et al.*, 1993).

Uma preparação de gel hidrofílica contendo 10% de sulfato de paromomicina foi avaliada em camundongos Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e hamster infectados com *L. (V.) braziliensis*, e quando comparadas com o tratamento com antimonialis, o gel utilizado contra *L. (L.) amazonensis* mostrou-se mais eficaz (Tiuman *et al*, 2011).

O tratamento tópico utilizando Miltex<sup>®</sup> reduziu a viabilidade parasitária em lesões em camundongos Balb/c, além de ser observada a cura das lesões em um tempo muito mais curto que as lesões do grupo não tratado (Schmidt-Ott *et al.*, 1999).

Larbi *et al.* (1995) verificaram a eficiência do tratamento tópico na LC na Arábia Saudita utilizando preparados contendo 1% de clotrimazol e 2 % de miconazol em um estudo clínico randomizado e duplo-cego. Neste estudo, foi observado que o clotrimazol foi

mais eficiente na redução das lesões, porém ainda muito limitado para o uso no tratamento da leishmaniose.

Outro estudo com formulação tópica foi utilizando a imidazoquinolina, uma droga aprovada para tratamento de verrugas genitais que em sistemas *in vitro*, apresentou atividade antileishmania por estimular a produção de óxido nítrico pelo macrófago infectado, diminuindo o número de parasitas. No estudo de Miranda-Verastegui *et al* (2005) realizado nas regiões endêmicas dos Andes peruanos e da selva peruana, foram incluídos 40 pacientes infectados pela *L. (V.) peruviana* ou *L. (V.) braziliensis*. O estudo avaliou a eficácia da combinação de imiquimod 5% tópico e antimonial pentavalente comparada ao uso de antimonial isolado durante 20 dias no tratamento da LC. A proporção de pacientes que alcançou a cura clínica nos primeiros meses após o fim do tratamento foi maior no grupo tratado com imiquimod e antimonial. Porém, foram relatados efeitos colaterais no grupo tratado com imiquimod, tais como, eritema, edema, prurido, queimadura e dor (Almeida e Santos, 2010).

Assim, esforços multidisciplinares continuam sendo importante para o desenvolvimento de um tratamento tópico eficaz no tratamento da LC, utilizando novos princípios ativos que podem atuar concomitantemente com fármacos já conhecidos com ação anti-leishmania.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-leishmania de extratos metanólicos e hexânicos e frações obtidos de *Libidibia ferrea* (Martius ex Tul.) LP Queiroz (Fabales: Fabaceae – “Caesalpinoideae”) espécie nativa do Brasil e encontrada na Amazônia brasileira utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, e estudar formulações de aplicação tópica para o tratamento de formas cutâneas da Leishmaniose.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de extratos hexânicos e metanólicos de *L. ferrea* quanto à atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*;
- Determinar a atividade dos extratos de *L. ferrea* em macrófagos infectados com as formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*;
- Fracionar os extratos mais promissores e avaliar a atividade das frações obtidas contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos e frações ativas de *L. ferrea* frente à linhagem de macrófagos para a determinação do índice de seletividade;

- Estudar a composição química dos extratos e das frações promissoras de *L. ferrea* por análises cromatográficas e espectrométricas a fim de identificar as classes das substâncias presentes;
- Investigar o efeito do tratamento tópico com frações ativas de *L. ferrea* e formulações contendo os fármacos padrões para o tratamento de leishmaniose tegumentar.
- Estudar o efeito do tratamento tópico em hamsters de formulações contendo extrato e fração com atividade em sistemas *in vitro* (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com *Leishmania*.

## **4. METODOLOGIA GERAL**

### **4.1 Método e local de pesquisa**

Este trabalho constitui-se de pesquisa experimental, sendo desenvolvido em sua porção majoritária nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS, Instituto Nacional e Pesquisas da Amazônia - INPA, coordenado pela Dra. Antônia Maria Ramos Franco.
- Laboratório de Produtos Naturais, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenado pelo professor Dr. Pierre Alexandre dos Santos (atualmente na Faculdade de Farmácia –UFG).
- Departamento de Química Inorgânica, Universidade de Helsinki, com a colaboração dos professores Dr. Andriy Grafov e Dra. Iryna Grafova

Utilizou, durante a execução do projeto, os seguintes laboratórios colaboradores:

- Laboratório de Vigilância em Leishmaniose. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, em colaboração com Aline Fagundes Silva.
- Laboratório de Histopatologia. Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em colaboração com Jose Fernando Barcellos Marques.
- Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros (ICTP) – CNR, em colaboração com Maurizio Avella e Gennaro Gentile.

### **4.2 Divisão da apresentação tese**

Os resultados apresentados na tese foram separados em cinco capítulos, de acordo com os objetivos mais específicos e a evolução dos resultados das etapas experimentais, visando discutir os resultados aos pares. Após a construção dos capítulos, o trabalho

apresenta uma discussão geral de todo o estudo aqui apresentado. Em anexo, estão apresentados os termos legais para o desenvolvimento deste estudo, assim como os valores integrais obtidos nas experimentações.

### **4.3 Coleta do material vegetal de *Libidibia ferrea***

Foram realizadas coletas para a obtenção do material vegetal (folhas, galhos e epicarpo) de *Libidibia ferrea* de uma propriedade particular no bairro Parque Dez de Novembro, Manaus, Amazonas. Coordenadas: 3°4'34"S 60°0'11"W. Para a coleta, foi obtida uma permissão do proprietário do local de obtenção deste material. Foram coletadas amostras de folhas, galhos e frutos. A coleta foi realizada no mês de julho de 2011, e o indivíduo consistia em um exemplar adulto em fase de frutificação.

Exsicatas foram preparadas e enviadas ao Departamento de Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, os indivíduos foram identificados quanto à espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz – Fabaceae “Caesalpinoideae” – de acordo com Lewis (2005) e APG III. A exsicata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o registro 246150.

### **4.4 Preparação dos extratos de *L. ferrea***

O material vegetal coletado foi imediatamente encaminhado ao laboratório de Produtos Naturais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Amazonas, para a preparação dos extratos.

As folhas foram separadas dos galhos e o fruto foi separado em epicarpo e semente. Todo o material, separado, foi seco em estufa de circulação forçada, com temperatura

inferior à 45 °C. Após a secagem, as partes foram moídas e pulverizadas em moinho de facas.

Após a pulverização, os materiais foram extraídos com hexano (VETEC) e metanol (VETEC). O esquema geral para a preparação de todos os extratos está ilustrado na figura 6. Foram realizadas três extrações ou mais, de acordo com a necessidade, com cada solvente utilizando banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração. O volume de cada solvente utilizado variou conforme a quantidade de material vegetal, mantendo a proporção de 250 mL de solvente para cada 100 g de material pulverizado, em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seco a temperatura ambiente (TA). Esse mesmo material vegetal foi extraído com os próximos solventes, em ordem crescente de polaridade. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (Buchi) e liofilizador

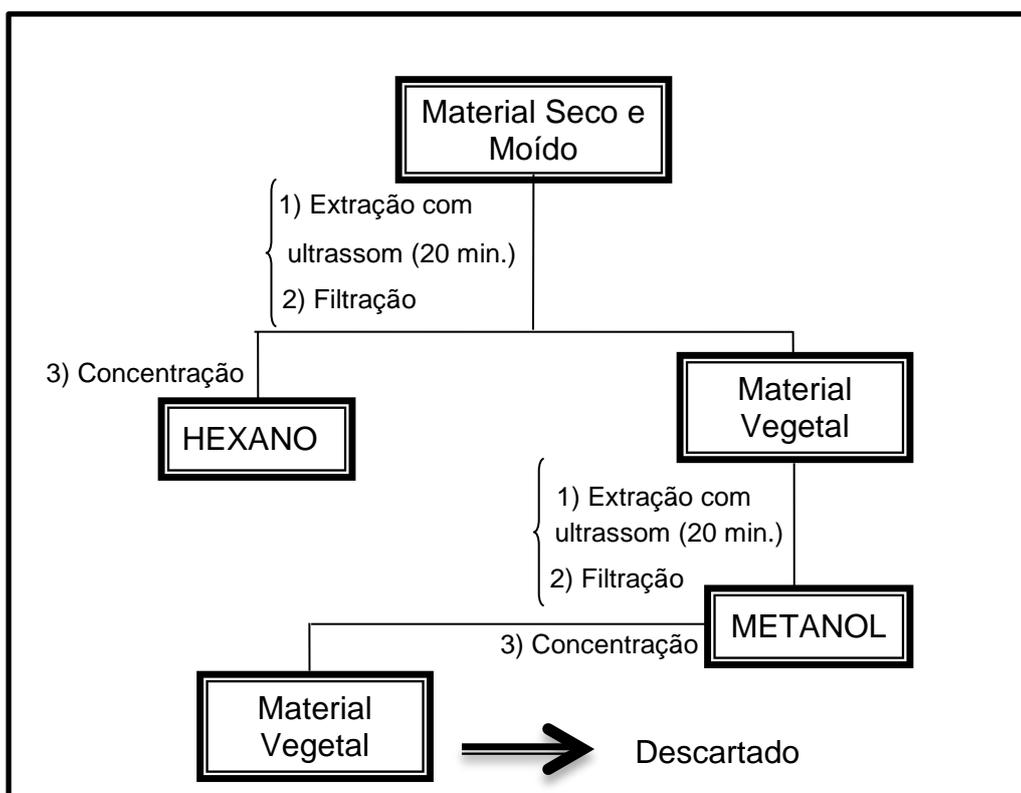


Figura 6 – Fluxograma geral da preparação dos extratos obtidos de galho, folhas e epicarpo de *Libidibia ferrea*.

#### **4.5 Partição dos extratos**

Os extratos foram fracionados por partição líquido-líquido. Para realizar as partições, 50 g do extrato metanólico foi solubilizada em 400 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1) e extraído três vezes (400 mL de solvente, cada vez) com cada um dos solventes utilizados na partição. As partições foram realizadas com Hexano, DCM, AcOEt e *n* - BuOH. Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para a avaliação da atividade leishmanicida.

#### **4.6 Curvas de padronização para determinação da abundância relativa de substâncias fenólicas e flavonoides**

Para a dosagem dos extratos e frações quanto ao teor de fenólicos totais, utilizou-se o Pirogalol como substância padrão para obtenção da curva padrão e comprimento de onda de 510 nm. A dosagem de flavonoides totais utilizou-se a comparação com quercetina e com naringenina e comprimento de onda de 415 nm. A metodologia para a dosagem de fenólicos e de flavonoides baseou-se na Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010). A curva-padrão é um ponto de referência também para a linearidade da relação entre concentração e absorbância no espectrofotômetro. A curva foi considerada apropriada para análise quando  $R > 0,98$ .

#### **4.7 Curva de crescimento de *Leishmania***

Para a determinação das fases de crescimento dos parasitas nas condições estabelecidas de cultivo, foi realizada a curva de crescimento em meio líquido Schneider

Insect Medium (Sigma®) suplementado com 10% de Soro fetal bovino inativado (SFBi). Os parasitas foram cultivados (forma promastigota das espécies estudadas) a partir de uma concentração de  $10^6$  células/mL. A contagem dos parasitas foi realizada em intervalos de 12 horas até a observação de menos de 10% de sobrevivência.

#### **4.8 Padrões de drogas utilizadas como controles *in vitro* e *in vivo***

##### 4.8.1 Padrões de bioensaios *in vitro*:

Pentamidina foi utilizada nas concentrações de diluição do composto isetonato de pentamidina (Pentcarinat®) sendo estas concentrações a máxima de 10 µg/mL e mínima de 0,0625 µg/mL.

##### 4.8.2 Padrões de bioensaios *in vivo*;

Antimoniato de meglumine (Glucantime®) foi utilizado como padrão de controle positivo nos experimentos *in vivo*. Foi utilizado tendo como base a dose indicada pela OMS (2012) de 20 mg/Sb<sup>V</sup>/Kg/dia.

## CAPÍTULO I

### ATIVIDADE *IN VITRO* ANTI-LEISHMANIA DE EXTRATOS DE *Libidibia ferrea*

#### (Mart Ex Tul.) LP Queiroz E PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS EXTRATOS

#### ATIVOS

Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski<sup>1</sup>, Pierre Alexandre dos Santos<sup>2</sup>, Angela Maria Comapa Barros<sup>1</sup>, Fabiane Veloso Soares<sup>1</sup>, Alana Vinhote<sup>1</sup>, Andriy Grafov<sup>3</sup> Antonia Maria Ramos Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Centro de Pesquisas em Ambiente, Saúde e Sociedade (CSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, 2936, Petrópolis. CEP 69061-001. Manaus, AM. Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás. Rua 240, esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário. CEP: 74605-170. Goiânia, GO. Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Química Inorgânica, Departamento de Química, Universidade de Helsinki. P.O. Box 55 (A.I. Virtasen aukio 1). Helsinki, Finlândia.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença endêmica causada por espécies do gênero *Leishmania*, originando as formas tegumentares (cutânea, muco-cutânea, cutânea-difusa) e visceral em humanos, afetando mais de 12 milhões de pessoas em todo mundo. O tratamento da leishmaniose tegumentar é difícil, devido ao escasso número de drogas capazes de eliminar completamente a forma intracelular do parasita. No presente estudo, o objetivo foi avaliar: i) atividade anti-*Leishmania* de diferentes extratos de *Libidibia ferrea* contra promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, ii) citotoxicidade e anti-amastigotas atividade dos extratos mais ativos e iii) propriedades fitoquímicas para guiar a identificação dos compostos ativos. A análise química mostrou que o extrato metanólico de epicarpo (EpMeOH) contém altos níveis de compostos fenólicos, como flavonóides. Extratos hexânicos das folhas (FoHEX) apresentou atividade contra *L. (L.) amazonensis*, com valor  $EC_{50}$  de 53,09  $\mu\text{g/mL}$  e extrato EpMeOH resultou em redução significativa de promastigotas viáveis de *L. amazonensis* com  $EC_{50}$  de 15,4  $\mu\text{g/mL}$ . FoMeOH foi extrato o mais ativo para *L. guyanensis*, com  $EC_{50}$  de 129,42  $\mu\text{g/mL}$  seguido de EpMeOH com um  $EC_{50}$  de 173,11  $\mu\text{g/mL}$ . Concentrações elevadas de flavonóides e fenólicos nos extratos ativos EpMeOH e FoMeOH guiaram para a avaliação de quercetina e naringenina comerciais, sendo que naringenina apresentou atividade contra *L. amazonensis* ( $EC_{50}$  0,26  $\mu\text{g/mL}$ ). EpMeOH demonstrou inibição potencial de formas amastigotas de *L. guyanensis* ( $EC_{50}$  303,36  $\mu\text{g/mL}$ ), e baixa citotoxicidade nas células de macrófagos J774.

Palavras-chave: *Leishmania*, produtos naturais, anti-*Leishmania*, Fabaceae, bioensaios, fenólicos

## ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease caused by species of genus *Leishmania*, originating cutaneous, muco-cutaneous and visceral leishmaniasis in humans and affecting more than 12 million people. Treatment of cutaneous leishmaniasis (LC) is difficult due to scarce number of drugs capable to eliminate completely the intracellular form of parasite. In the present study, the aim was evaluate: i) anti-leishmanial activity of different extracts of *Libidibia ferrea* against promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis*, ii) cytotoxicity and anti-amastigotes activity of more active extracts and iii) phytochemical properties to lead the identification of the active compounds. Chemical analysis showed that the methanolic extract from epicarp (EpMeOH) contain high levels of phenolic compounds, like flavonoids. Leaves hexane extracts (LeaHEX) showed activity against *L. amazonensis*, with EC<sub>50</sub> value of 53.09 µg/mL after 48 hours and EpMeOH extract resulted in significant reduction of viable promastigotes of *L. amazonensis* with EC<sub>50</sub> of 15.4 µg/mL in 48 hours. LeaMeOH extract was the most active for *L. guyanensis*, with EC<sub>50</sub> 129.42 µg/mL in 24 hours, follow by EpMeOH with a EC<sub>50</sub> of 173.11 µg/mL in 24 hours. Due high levels of flavonoids content determinate in active extract EpMeOH and LeaMeOH, quercetin and naringinin were evaluated and naringinin showed activity against *L. amazonensis* (EC<sub>50</sub> 0.26 µg /mL). EpMeOH demonstrated inhibition potencial of amastigotes forms of *L. guyanensis* (EC<sub>50</sub> 303.36 µg/mL), and low cytotoxicity in cells of macrophages J774.

**Key words:** *Leishmania*, natural products, anti-leishmanial, Fabaceae, bioassays, phenolics

## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 98 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de dois milhões de novos casos registrados por ano e mais de 15 milhões de pessoas infectadas no Mundo, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas (Alvar *et al.*, 2012). Em 2011 foram notificados mais de 57.000 casos da leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas, sendo no Brasil a maior concentração de casos, cerca de 40% (PAHO, 2013).

Os parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), são protozoários digenéticos (heteroxenos), que tem o seu ciclo biológico desenvolvido em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Esses parasitas apresentam duas formas evolutivas distintas: *i) amastigota*: forma arredondada ou oval com 2 a 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com um núcleo esférico e compacto, sem flagelo livre. Esta forma é intracelular, multiplicando-se nos macrófagos da pele e em vísceras dos hospedeiros vertebrados; *ii) promastigota*: é fusiforme, com 16 a 18  $\mu\text{m}$  de longitude e é flagelada. Esta forma encontra-se no tubo digestivo do flebotomíneo transmissor e também pode ser observada em meio de cultura (Lainson e Shaw, 1979).

Quando os promastigotas de *Leishmania* são pela primeira vez introduzidos na pele humana, o parasitismo induz a proliferação das células histiocitárias e a fagocitose dos flagelados por macrófagos teciduais que, além de não conseguirem destruir os parasitas, ainda permitem sua multiplicação no interior dos vacúolos digestivos. Os amastigotas multiplicam-se livremente no compartimento ácido dos fagolisossomas e escapam dos sistemas de defesa do hospedeiro (Frezard *et al.* 2005). A interação macrófago-promastigota é um fenômeno mediado primariamente pela protease gp63, lipofosfoglicano, além

receptores como manose-fucose, receptor de complemento (CR1 e CR3) e receptor Fc (Tanaka *et al.*, 2007).

Os fármacos conhecidos e utilizados para o tratamento da leishmaniose tegumentar apresentam uma série de dificuldades que incluem resistência do parasita e indução de efeitos colaterais, que limitam sua utilização e, principalmente, a eficácia. Além disso, todos os fármacos que estão disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente e, que infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Silva-Lopez, 2010).

Estudos com produtos naturais têm mostrado potencial de extratos, frações, substâncias e óleos obtidos de espécies encontradas em diferentes espécies vegetais (Rocha *et al.*, 2005). Atividade leishmanicida foi detectada em benzofenonas preniladas isoladas de *Garcinia brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2010) e também em óleo de copaíba extraído de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (Santos *et al.*, 2008).

Uma mistura de alcaloides extraídos de *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) mostrou atividade inibitória em amastigotas de *Leishmania. (Viannia) braziliensis* em sistemas *in vitro* (Rodriguez *et al.*, 2008). Alcaloides oxoaporfínicos isolados de *Annona mucosa*, assim como, extratos de folhas e sementes desta espécie também apresentaram resultados de inibição *in vitro* em promastigotas e amastigotas de três espécies de leishmanias (Lima, *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos, naturais ou modificados por síntese, também têm demonstrado atividade leishmanicida, como chalconas polisubstituídas que mostraram atividade contra *L. (L.) amazonensis*, *L.(V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis* (Aponte *et al.* 2010). Neolignanas naturais isoladas de *Virola surinamenis* mostraram atividade inibitória contra *L. (L.) donovani* (Barata *et al.*, 2000), assim como, flavonoides isolados das folhas de

*Baccharis retusa* foram ativos contra espécies de *Leishmania* sp nas formas amastigotas e promastigotas (Greco *et al*, 2012).

A espécie *Libidibia ferrea* var *ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz, (*Caesalpinia ferrea* basiônimo), é conhecida popularmente como pau-ferro, jucá, pau-ferro-verdadeiro, jucaína e pau de jucá (Souza e Lorenzi, 2012). Pertence a família Fabaceae – subfamília Caesalpinoideae, considerada uma das mais importantes famílias botânicas, distribuída em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estudos químicos com esta espécie têm demonstrado a presença de compostos fenólicos com possíveis aplicações farmacológicas, como chalconas e polifenóis (Nakamura *et al*, 2002; Nozaki *et al*, 2007).

A atividade antimicrobiana dos frutos de *L. ferrea* contra patógenos orais foi avaliada por Sampaio *et al*. (2009), indicando que o extrato inibiu o crescimento *in vitro* de espécies como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus* sp. e *Candida albicans*. Estudos químicos deste extrato por técnica de Ressonância Magnética Nuclear revelaram a presença de hidroxilas fenólicas e compostos metoxilados (Sampaio *et al*, 2009). Atividade cicatrizante dos frutos de Jucá foi verificada em estudos *in vivo* utilizando caprinos como modelo experimental (Oliveira *et al*, 2010), apresentando aspectos clínicos de cicatrização mais rápida que o grupo controle. Testes *in vitro* demonstraram a atividade leishmanicida de extratos de frutos, sementes e partes dos frutos de *L. ferrea* para as espécies *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) guyanensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010).

O presente estudo tem por objetivo a avaliação da atividade anti-leishmania de extratos obtidos de folhas, galhos e frutos de *L. ferrea* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* em sistemas *in vitro*, avaliar a atividade citotóxica, e determinar propriedades químicas dos extratos mais ativos, guiando o fracionamento para a obtenção das substâncias e frações mais ativas.

## **METODOLOGIA**

**Coleta do material vegetal:** As partes vegetais (folhas, galhos e epicarpo) foram coletadas de um indivíduo de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz presente em uma propriedade particular do bairro Parque Dez de Novembro, Manaus, Amazonas, no período de frutificação da espécie (junho). Exsicata preparada foi identificada pelo pesquisador Dr. Mike Hopkins, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, e depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o número de identificação 246150.

**Preparação dos extratos:** O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada, com temperatura inferior a 45 °C. Após a secagem, as partes foram moídas e pulverizadas em moinho de facas. Após a pulverização, os materiais foram extraídos com hexano e metanol (VETEC®). Foram realizadas três extrações com cada solvente utilizando banho de ultrassom por 20 minutos, em cada extração. O volume de cada solvente utilizado manteve a proporção de 250 mL de solvente para cada 100 g de material pulverizado, em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seco à temperatura ambiente. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (Büchi).

**Abordagem fitoquímica:** Os extratos obtidos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, empregando-se diferentes sistemas de eluição, e reveladores físicos (luz ultravioleta) e químicos (anisaldeído sulfúrico, iodo ressublimado, reagente de Dragendorff e cloreto férrico). Esta análise teve por objetivo uma avaliação preliminar da

presença das classes de substâncias presentes nos extratos e frações, como terpenos e esteroides, alcaloides e compostos fenólicos, tais como os flavonoides.

**Dosagem de fenólicos totais e flavonoides totais:** Para a dosagem de fenólicos totais, os extratos foram dissolvidos em metanol ou isopropanol (Prolabo<sup>®</sup>) e o volume de 1000 µL das amostras (1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) foi diluído em 2000 µL de trietanolamina 5% e 1000 µL de cloreto férrico 0,165%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (510 nm), e as reações foram realizadas em triplicata e comparadas com curva padrão com concentrações conhecidas de pirogalol (Merk<sup>®</sup>). Para a dosagem de flavonoides totais, os extratos foram dissolvidos em metanol ou isopropanol, e o volume de 500 µL das amostras (1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) foi diluído em 100 µL de acetato de sódio 1,0 mol. L<sup>-1</sup> e 100 µL cloreto de alumínio 10%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (415 nm) e as reações foram realizadas em triplicata e comparadas com curva padrão de concentrações conhecidas de naringenina e quercetina (Merk<sup>®</sup>). A metodologia para a dosagem de fenólicos e de flavonoides baseou-se na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Os resultados são expressos em abundância relativa porcentual e calculados pela equação:

$$[\text{Pyrogalol/ Quercetina/ Naringenina}]_{\text{eq}} = (|\Delta\text{ABS}| - a) / b \times 100$$

*a* = coeficiente linear da curva de pyrogalol/Quercetina/naringenina

*b* = coeficiente angular da curva de pyrogalol/Quercetina/naringenina

### **Bioensaios *in vitro***

**Cultivo celular e preparo de massa parasitária:** foram utilizadas as espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHO/BR/95/M4147),

mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS, INPA. As formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* para utilização nos bioensaios *in vitro* foram mantidas e cultivadas em meio Drosophila Medium Schneider completo (Sigma), suplementado com 10% de SFBi e gentamicina (40 µg/mL), e mantidos em estufa a 25 °C, de acordo com JAFFE et al. (1984). Foi realizada curva de crescimento previamente à realização dos bioensaios. Os macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em meio RPMI-1640 (Himedia<sup>®</sup>) em garrafas de cultura em estufa a 37 °C.

**Avaliação da atividade anti-leishmania em promastigotas:** Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, empregando formas promastigotas em fase logarítmica tardia (10<sup>6</sup> células/mL), com a metodologia de acordo com Fumarola et al. (2004). Os extratos de *L. ferrea* foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO – Vetec<sup>®</sup>), (3% v/v) e em meio Schneider sem adição de SFBi e filtrados em membrana Millipore<sup>®</sup> 0,22 µm em ambiente estéril. Extratos de *L. ferrea* foram avaliados nas concentrações de 500 a 32 µg/mL, os flavonoides quercetina e naringenina foram avaliados nas concentrações de inferiores a 30 µg/mL. Pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>) foi utilizada como controle positivo na concentração máxima de 10 µg/mL e mínima de 0,0625 µg/mL e DMSO (3%v/v) foi utilizado como controle negativo. A atividade das amostras foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* nos períodos de 24, 48 e 72 horas, na temperatura de 25 °C em estufa. Os bioensaios foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes. A contagem dos parasitas foi realizada em hemocítômetro. A média do número de células vivas foi utilizada para calcular por regressão linear e calcular os valores de CE<sub>50</sub> (concentração efetiva para 50% dos parasitas). O valor da CE<sub>50</sub> é utilizado para expressar os resultados das atividades das amostras avaliadas e selecionar as que se apresentam mais ativas para estudos posteriores.

**Avaliação da atividade citotóxica em Macrófagos:** macrófagos da linhagem J774 ( $10^5$  células/mL) foram cultivados previamente em placa de polietileno de 24 poços contendo meio RPMI 1640 com a suplementação de 10% de SFBi (Biosul), durante 24 horas a 37 °C. Após este período, houve a troca do meio com a adição de concentrações dos extratos de *L. ferrea*. A incubação dos macrófagos foi em estufa a 37 °C, por 48 horas na presença das amostras. Após este período foi adicionado 20 µL do reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazolium) (Roche®) e após 4 horas de incubação foram adicionados 100 µL de solução de solubilização. Os macrófagos foram incubados por mais 12 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras colorimétricas em espectrofotômetro (Bio-Tek®), utilizando os comprimentos de onda de 590 nm. O cálculo para a obtenção do valor de  $CE_{50}$  foi por regressão linear. A avaliação ocorreu também pela contagem de macrófagos viáveis utilizando o reagente Azul de Tripán, e visualização em microscópio óptico.

**Avaliação da atividade anti-leishmania em amastigotas intracelulares:** macrófagos da linhagem J774 foram incubados em placa de 24 poços ( $10^5$  células/mL), em meio RPMI-1640 completo a 37°C, por 48 horas. Após este período, os macrófagos ( $1,0 \times 10^5$  células/mL) foram infectados com  $10^6$  promastigotas/mL (1:10 célula/parasita) por, no máximo, quatro horas. As espécies de *Leishmania* avaliadas foram *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Em seguida, os poços foram lavados com RPMI para a remoção dos promastigotas não interiorizados. Os macrófagos infectados com promastigotas foram incubados na presença dos extratos de *L. ferrea* que apresentaram maior potencial anti-leishmania contra promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e ausência de atividade citotóxica. Após 48 horas de incubação em estufa a 37 °C, os poços foram lavados

com solução salina, as lamínulas de vidro foram removidas, e as células infectadas fixadas e coradas utilizando método panótico adaptado para testes utilizando macrófagos. Foram avaliados o número de macrófagos infectados (200 macrófagos por replicata) e o número de amastigotas por macrófagos. A avaliação destes parâmetros foi realizada por observação em microscópio óptico. Pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>) foi utilizada como controle positivo do experimento, enquanto o controle negativo correspondeu às células infectadas com os parasitos na presença de DMSO (3% v/v). O valor de CE<sub>50</sub> para a forma amastigota foi calculado utilizando regressão linear.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este trabalho buscou verificar a atividade antiparasitária contra espécies de *Leishmania* de diferentes extratos obtidos da espécie vegetal *Libidibia ferrea*. O extrato que apresentou maior rendimento foi o extrato metanólico do epicarpo (EpMeOH) (tabela 3), possuindo até 40% de rendimento. Os extratos hexânicos, porém, apresentaram rendimento muito baixo, onde todas as partes extraídas com hexano mostraram rendimento abaixo de 2% (tabela 3). Este fato pode ser atribuído a presença de compostos com maior polaridade em maior quantidade, como já anteriormente verificado por Falcão (2010).

Com o objetivo de obter o perfil dos principais grupos de produtos naturais presente nos extratos de *L. ferrea* e comparar o perfil com a literatura, direcionando os estudos químicos, os extratos e frações foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). A fase móvel DCM:AcOEt (9:1 v/v) apresentou a melhor resolução para os extratos hexânicos. Os extratos metanólicos apresentaram melhor resolução na cromatoplaça quando eluídos com a fase AcOEt:MeOH (2:8 v/v). Os extratos metanólicos, quando revelados com cloreto férrico, apresentaram forte reação e bandas bem

acentuadas, principalmente o extrato EpMeOH. O reagente de Dragendorff foi o único que não revelou nenhuma mancha para nenhum extrato, o que mostra a baixa concentração ou ausência de alcaloides. Estudos em relação à composição química de espécies do gênero *Caesalpinia* ou *Libidibia* mostram que as substâncias fenólicas, especialmente taninos e flavonoides, são as mais representativas nos extratos obtidos destes exemplares (UEDA *et al.* 2001). Dentre os constituintes químicos descritos na literatura para o gênero *Libidibia* destaca-se a presença de polifenóis. Outra classe de substâncias que tem sido caracterizada são os terpenoides, que em geral são extraídos com solventes de baixa polaridade (COTA *et al.*, 2011).

Tabela 3 – Rendimento dos extratos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) LP Queiroz

<b>Parte</b>	<b>Material seco (g)</b>	<b>Extrato Hex (g)</b>	<b>Rendimento Hex (%)</b>	<b>Extrato MeOH (g)</b>	<b>Rendimento MeOH (%)</b>
Epicarpo	2,100	3,8	0,18	850	40,4
Folhas	160	2,42	1,51	24,73	15,45
Galhos	200	3,0	1,5	25,0	12,5

Devido à verificação da presença de compostos fenólicos nos extratos e os relatos de atividades biológicas que estas substâncias apresentam, os extratos foram submetidos à análise do teor de substâncias fenólicas e de flavonoides. Durante as diluições dos extratos hexânicos dos galhos e do epicarpo com os reagentes utilizados para as reações da quantificação de flavonoides, ocorreu a turbidez da solução, que se manteve persistente mesmo após agitação, inviabilizando os resultados com estes extratos.

Os extratos metanólicos apresentaram uma concentração elevada de compostos fenólicos, possuindo 5,14% deste grupo de substâncias presentes nos extratos do epicarpo e

4,94% presente nos extratos das folhas (tabela 4). Entre os compostos fenólicos, o grupo dos flavonoides também apresentou uma abundância relativa elevada. Quando comparadas entre a equivalência com quercetina (flavonol) e a naringenina (diidroflavona), a primeira mostrou teores mais elevados em ambos os extratos.

Tabela 4 – Determinação da abundância relativa de fenólicos e flavonoides presentes nos extratos de *Libidibia ferrea*

<b>Extratos</b>	<b>% Fenólicos totais*</b>	<b>% Flavonoides (Quercetina)</b>	<b>% Flavonoides (Naringenina)</b>
FoHex	1,28 ± 0,19	0,66 ± 0,07	0,52 ± 0,09
FoMeOH	4,94 ± 0,17	2,21 ± 0,14	1,91 ± 0,06
FoHCl**	4,318 ± 0,27	0,427 ± 0,08	2,465 ± 0,10
FoNH <sub>4</sub> OH***	3,220 ± 0,42	0,326 ± 0,09	1,876 ± 0,17
EpMeOH	5,14 ± 0,23	1,90 ± 0,13	1,64 ± 0,19
EpHCl**	2,677 ± 0,16	1,507 ± 0,12	1,584 ± 0,11
EpNH <sub>4</sub> OH***	0,438 ± 0,08	0,5676 ± 0,09	0,3846 ± 0,02

\* A abundância relativa dos fenólicos totais utilizou como padrão a reação com pirogalol.

\*\* Extratos preparados com solução acidificada por HCl (pH = 4,0)

\*\*\* Extratos preparados com solução alcalina de NH<sub>4</sub>OH (pH = 9,5)

Port's (2011) observou em um estudo com nove espécies vegetais, preparados na forma de chás, que os teores mais elevados de compostos fenólicos estavam presentes na espécie *L. ferrea*. Ácido gálico e ácido elágico foram quantificados por HPLC em extratos dos frutos de *L. ferrea* por Cunha et al. (2012), indicando valores acima de 2,49% de ácido gálico e 5,89% de ácido elágico. Estes valores obtidos foram muito próximos à concentração observada no extrato metanólico dos frutos, indicando uma constância do elevado teor de compostos fenólicos produzidos por *L. ferrea*, mesmo em indivíduos presentes em regiões

de condições ambientais diferenciadas. No trabalho realizado por Cunha et al. (2012), a melhor metodologia extratora dos compostos de *L. ferrea* empregou solventes com pH 4,6 sob aquecimento a 75 °C. Por este motivo, uma alíquota de 200 g de material vegetal pulverizado foi extraído também com soluções acidificadas com ácido clorídrico (pH 4,0) e alcalinizadas com hidróxido de amônio (pH 9,5). A concentração de compostos fenólicos presentes no extrato ácido (2,66%) foi menor que no extrato metanólico (5,14%) do epicarpo.

Considerando o levantamento de trabalhos realizados anteriormente com os extratos de *L. ferrea*, o jucá, frente ao tratamento da leishmaniose, verificou-se que os extratos dos frutos, sementes e do epicarpo foram avaliados quanto a sua ação em promastigotas de *L. (V.) guyanensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010). Partes diferentes de um mesmo indivíduo podem apresentar uma grande variação quanto aos metabólitos secundários presentes, assim como o teor destes metabólitos, e, conseqüentemente podem apresentar uma ação biológica diferente. Por este motivo, as folhas e os galhos de jucá, disponíveis para a coleta em qualquer período do ano, diferente dos frutos, também foram avaliados quanto à ação de seus extratos (hexânico e metanólico) frente a *L.(L.) amazonensis*.

A tabela 5 apresenta os valores calculados de CE<sub>50</sub> da avaliação dos extratos contra as formas promastigotas de *Leishmania*. Observa-se que o extrato mais promissor foi o extrato metanólico do epicarpo (EpMeOH) com o CE<sub>50</sub> de 15,04 µg/mL (tabela 5) contra *L.(L.) amazonensis* (PH8). Porém, este extrato apresentou menor atividade contra a cepa *L. amazonensis* (IM 5584) e atividade baixa contra *L. (V.) guyanensis*. Quando avaliado a atividade em relação ao tempo de incubação na presença deste extrato, observa-se que há uma estabilidade na concentração de parasitas viáveis entre 48 e 72 horas (figuras 7, 8 e 2), o que pode indicar uma atividade acumulativa deste extrato, impedindo a multiplicação de células viáveis, seja por alguma ação tóxica moderada a leve ou por restrição metabólica.

Este extrato apresentou concentrações elevadas de fenólicos, os quais já mostraram atividade inibitória na síntese de DNA, por interações com a topoisomerase II de *Leishmania* (Sen & Chatterje, 2011).

Tabela 5 – Atividade anti-leishmania em promastigotas em seus valores calculados de CE<sub>50</sub> por regressão linear (modelo Deming) para os extratos de epicarpo, folhas e galhos de *Libidibia ferrea*.

Amostras	CE <sub>50</sub> [µg/mL]		
	<i>L. amazonensis</i> (IM 5584)	<i>L. amazonensis</i> (PH8)	<i>L. guyanensis</i> (M4147)
EpHex	> 500	> 500	> 500
FoHex	53,09 ± 4,48	106,38 ± 2,99	> 500
GaHex	> 500	455 ± 6,62	> 500
EpMeOH	161,38 ± 3,71	15,04 ± 2,54	173,11 ± 1,86
FoMeOH	307,46 ± 2,49	210,21 ± 2,26	129,42 ± 2,79
GaMeOH	> 500	322 ± 6,9	178,38 ± 2,99
Quercetina	16,94 ± 0,22	Nt*	14,91 ± 0,19
Naringenina	0,26 ± 0,21	Nt*	0,74 ± 0,15
Pentamidina	1,62 ± 0,10	2,93 ± 0,82	1,25 ± 0,07

\*Nt = não realizado o teste

O segundo extrato com maior atividade foi o extrato hexânico das folhas (FoHex), o qual mostrou maior atividade contra *L.(L.) amazonensis* (IM 5584), com valor de CE<sub>50</sub> de 53,09 µg/mL. Os demais extratos hexânicos não apresentaram atividade na maior concentração testada para *L. (L.) amazonensis*. Porém o extrato FoHex apresentou baixa atividade anti-leishmania quando avaliado seu potencial contra *L.(V.) guyanensis* (figura 29) apresentando EC<sub>50</sub> de 430,50 µg/mL (tabela 5).

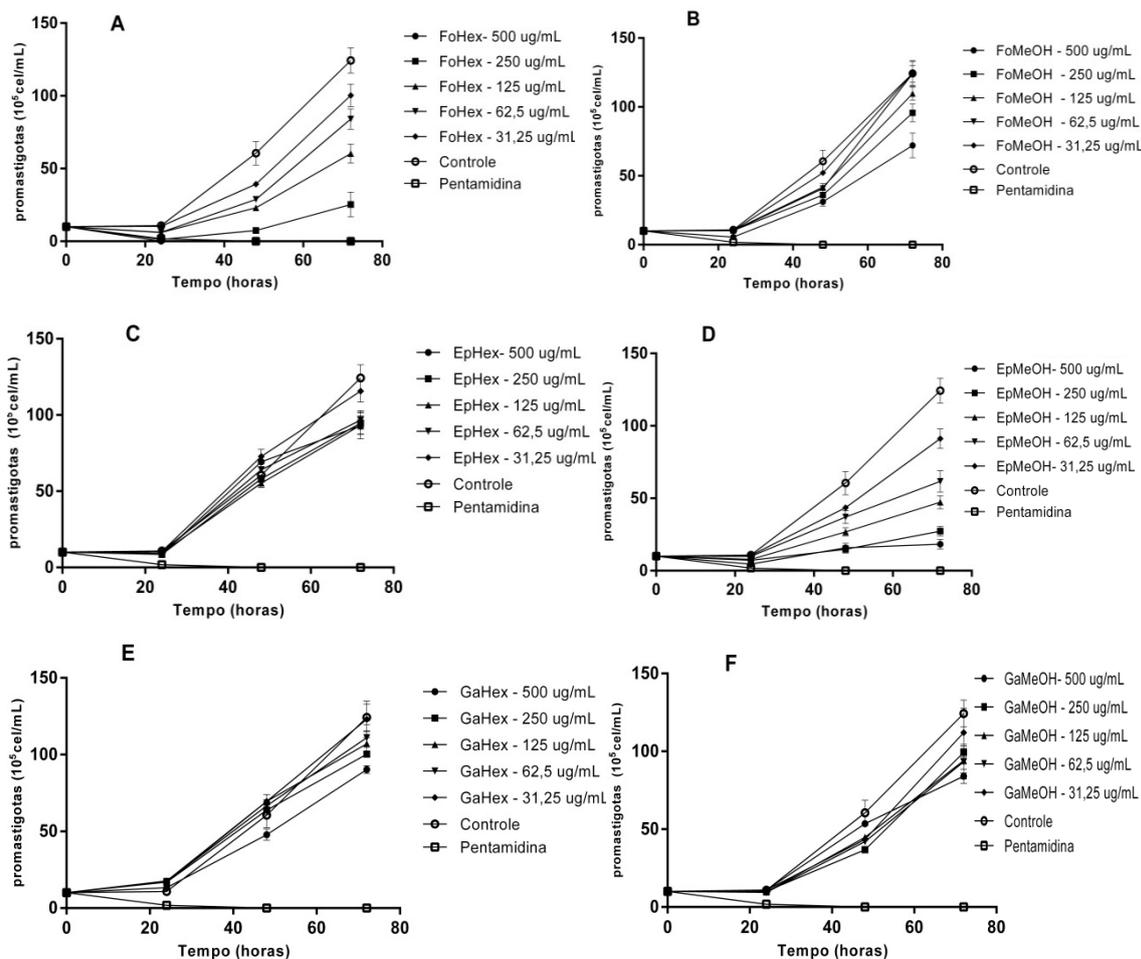


Figura 2 - Atividade anti-leishmania dos extratos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584). A- Extrato hexano das folhas B – Extrato metanólico das folhas C – Extrato hexano do epicarpo D – extrato metanólico do epicarpo E – extrato hexano dos galhos F – extrato metanólico dos galhos. Os parasitas ( $10^6$  cell/mL) foram cultivados em diferentes concentrações 25 °C e avaliados em 24, 48 e 72 horas. Pentamidina (Pentacarinat® 10  $\mu$ g/mL) foi usado como controle positivo e o controle negativo é considerado a concentração de parasitas em meio Schneider.

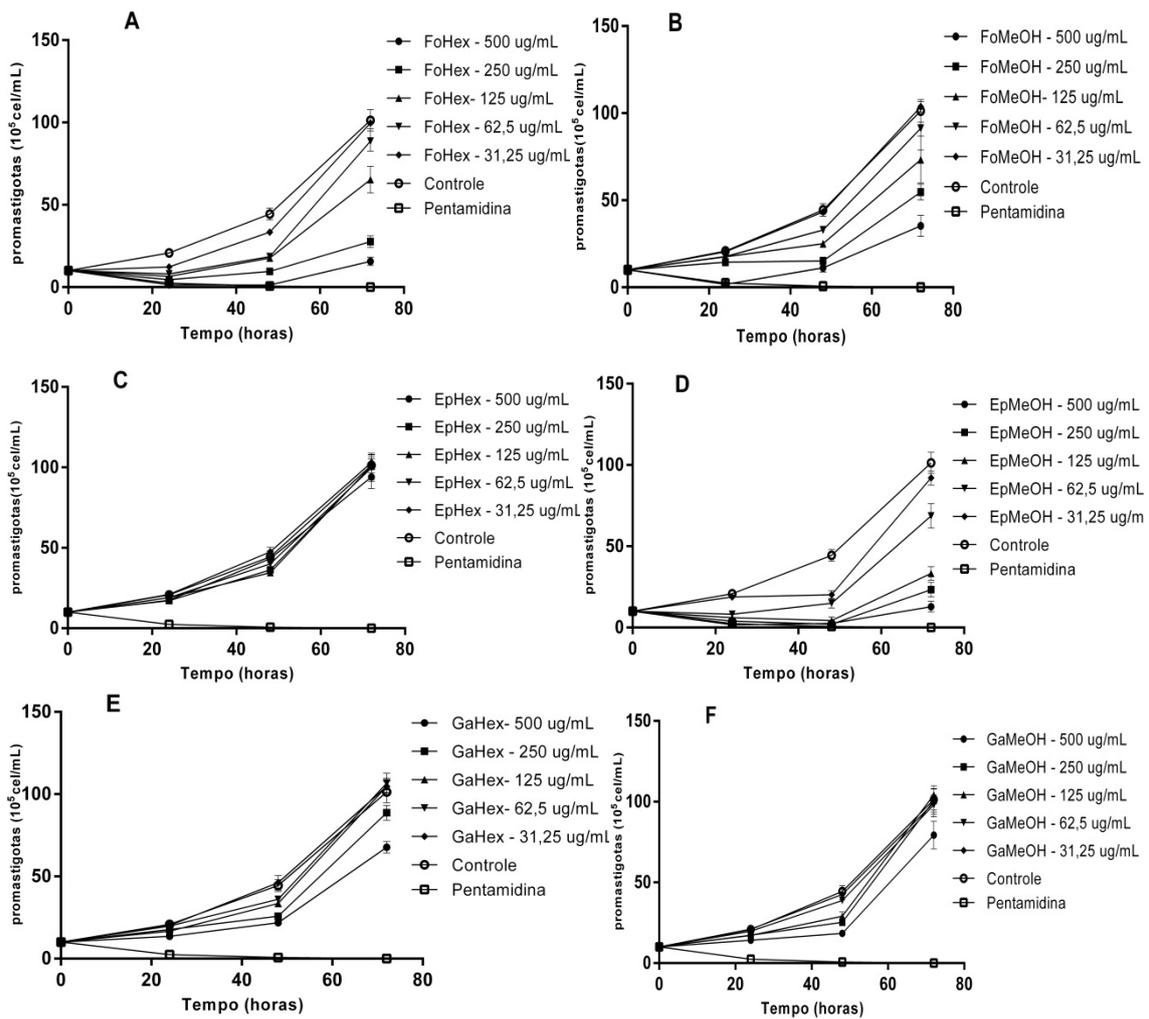


Figura 3 Atividade anti-leishmania dos extratos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). A- Extrato hexano das folhas B – Extrato metanólico das folhas C – Extrato hexano do epicarpo D – extrato metanólico do epicarpo E – extrato hexano dos galhos F – extrato metanólico dos galhos. Os parasitas ( $10^6$  células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações 25 °C e avaliados em 24, 48 e 72 horas. Pentamidina (Pentacarinat® 10  $\mu$ g/mL) foi usado como controle positivo e o controle negativo é considerado a concentração de parasitas em meio Schneider.

Para a espécie *L. (V.) guyanensis*, o extrato que mostrou maior atividade foi extrato metanólico das folhas (FoMeOH), com valor de EC<sub>50</sub> de 129,42 µg/mL (figura 9). Quando verificada a atividade frente a *L. (L.) amazonensis* (PH8), esta cepa mostrou-se mais susceptível a presença dos extratos, sendo o extrato EpMeOH o mais ativo, com EC<sub>50</sub> de 15,4 µg/mL. Os resultados da atividade contra *L. (V.) guyanensis* dos extratos metanólicos mostram que a maior atividade foi observada no período de 24 horas de incubação, sendo o extrato mais promissor o FoMeOH, com EC<sub>50</sub> de 83,35 µg/mL, seguido do extrato EpMeOH com EC<sub>50</sub> de 89,39 µg/mL.

Padrões comerciais de quercetina e naringenina (Merk®) e o fármaco isotianato de pentamidina (Pentacarinat®) foram avaliados quanto a atividade contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. O flavonóide naringenina foi mais ativo, principalmente com resultados contra *L. amazonensis*, com EC<sub>50</sub> de 0,26 µg/mL. Os valores de EC<sub>50</sub> de quercetina e naringenina foram utilizados para comparação com os dos extratos, tomando como relação o percentual de flavonoides determinados pela reação com cloreto de alumínio.

O extrato EpMeOH apresenta 1,9% de equivalência com a quercetina, o que representaria 3,05 µg/mL do valor de EC<sub>50</sub> observado contra *L. (L.) amazonensis* e 5,18 µg/mL para *L. (V.) guyanensis*. Comparando com os valores observados para a quercetina isolada, 16,94 e 14,91 µg/mL respectivamente para cada espécie, pode-se verificar que os valores mais baixos encontrados nos extratos indicam que a atividade deve ser atribuída ao conjunto com outros metabólitos secundários, podendo indicar sinergismo. Entretanto, quando se compara os valores de EC<sub>50</sub> do flavonoide naringenina, em relação ao seu equivalente com este extrato, há um valor menor para a naringenina isolada (0,26 µg/mL para *L. (L.) amazonensis*) enquanto o extrato corresponde a 2,64 µg/mL para esta espécie.

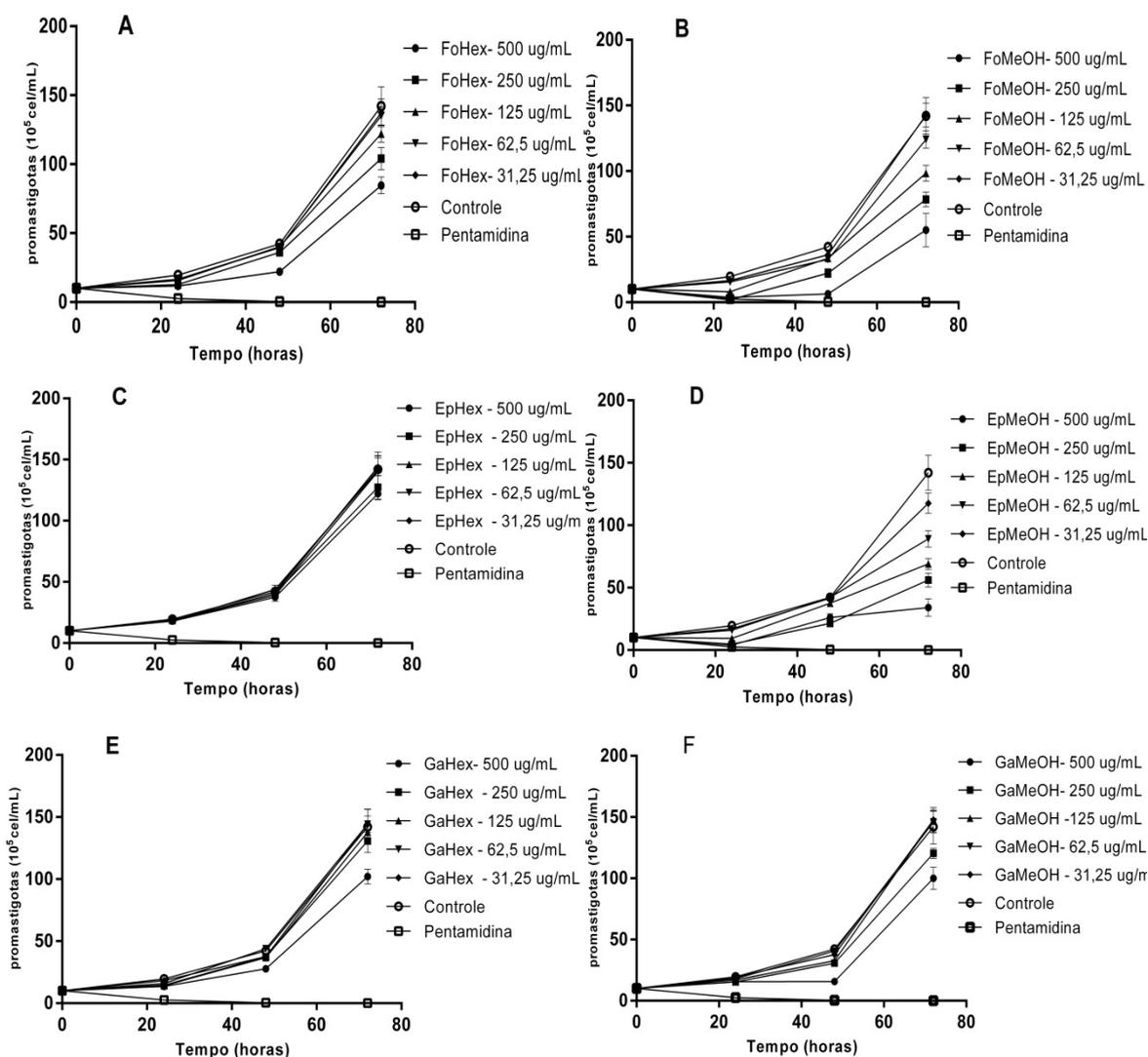


Figura 4 - Atividade anti-leishmania dos extratos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147) A- Extrato hexano das folhas B – Extrato metanólico das folhas C – Extrato hexano do epicarpo D – extrato metanólico do epicarpo E – extrato hexano dos galhos F – extrato metanólico dos galhos. Os parasitas ( $10^6$  células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações 25 °C e avaliados em 24, 48 e 72 horas. Pentamidina (Pentacarinat® 10 µg/mL) foi usado como controle positivo e o controle negativo é considerado a concentração de parasitas em meio Schneider.

Quando avaliado o potencial citotóxico dos extratos mais promissores - EpMeOH, FoMeOH e FoHex - o extrato EpMeOH mostrou-se menos citotóxico (figura 10), com EC<sub>50</sub> acima de 500 µg/mL. O índice de seletividade (IS) calculado para *L. (L.) amazonensis* para o extrato EpMeOH foi 5,68 (tabela 6). Por este motivo este extrato foi selecionado para avaliação do potencial anti-leishmania nas formas intracelulares em macrófagos infectados (figura 11 e 12). Os resultados mostraram que o extrato metanólico mostrou baixa atividade contra *L. (L.) amazonensis* (IM5584) e maior atividade contra *Leishmania (V.) guyanensis*. O valor de EC<sub>50</sub> para amastigotas de *L. (V.) guyanensis* foi de 303,36 µg/mL.

Avaliando em conjunto os resultados químicos com os biológicos, o extrato Epicarpo MeOH é o mais promissor para futuros estudos, apresentando alto rendimento de extração, alto teor de fenólicos e flavonoides, atividade contra as formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e amastigota de *L. (V.) guyanensis*, além de apresentar baixa citotoxicidade em macrófagos J774.

Tabela 6 – Atividade citotóxica em macrófagos J774 e o IS calculado para para os extratos mais promissores *Libidibia ferrea* quando avaliados contra as formas promastigotas de *Leishmania. (Leishmania) amazonensis e Leishmania. (Viannia) guyanensis*.

Extratos	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	IS	
	Macrófagos J774	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
ExEpMeOH	> 500	> 5,68	> 1,83
ExFoMeOH	281,89 ± 3,83	0,92	0,46
ExFoHex	285,28 ± 4,9	3,58	0,66

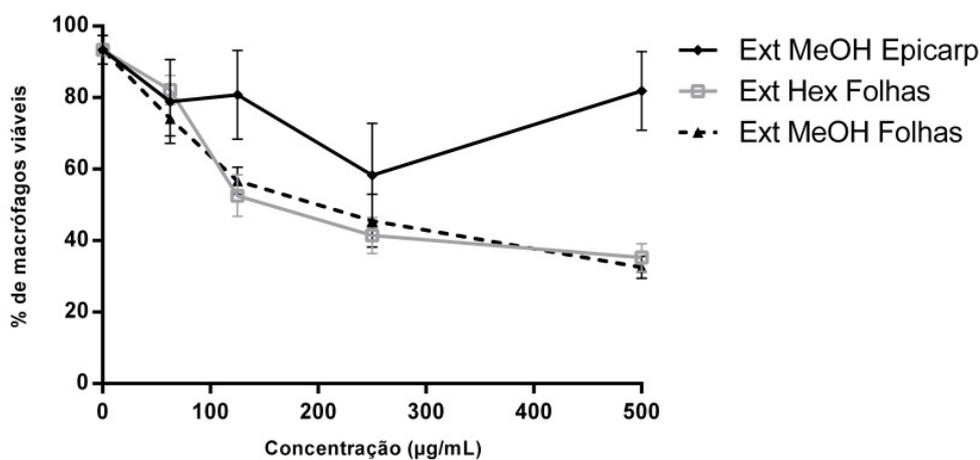


Figura 5 - Atividade citotóxica dos extratos mais ativos em macrófagos de linhagem MJ774 incubados a 37° C por 48 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica (MTT) e contagem em Hemocítômetro empregando o corante vital Azul de Tripán.

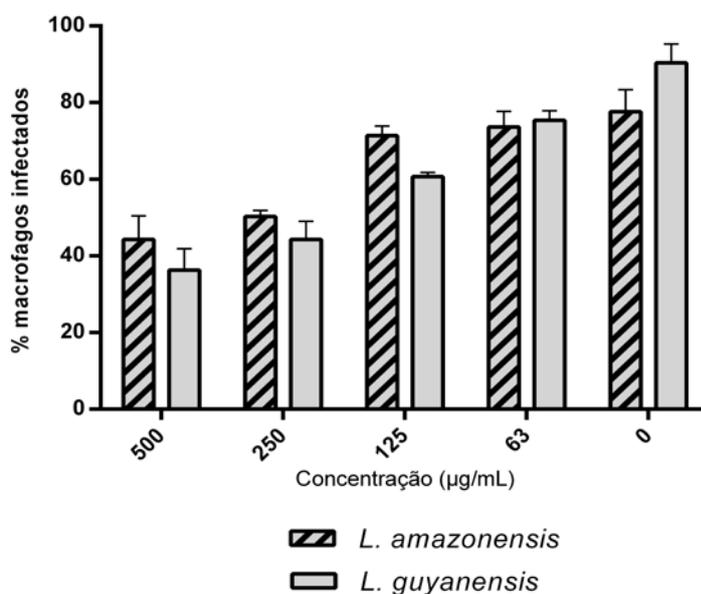


Figura 6 - – Atividade do extrato metanólico do epicarpo de *Libidibia ferrea* frente a formas amastigotas interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. Espécies: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147). Incubação 48 horas a 25 °C.

Os resultados em amastigotas mostraram que o extrato EpMeOH apresentou um potencial de atividade com valor mais elevado, embora relatos na literatura mostrem que esse perfil é comum quando as substâncias são avaliadas frente as formas amastigotas, pois envolvem mecanismos bioquímicos, como a entrada nas células hospedeiras (Singh *et al.*, 2014). Observou-se por microscopia que a morfologia celular do macrófago permaneceu íntegra mesmo na presença do EpMeOH (figura 12).

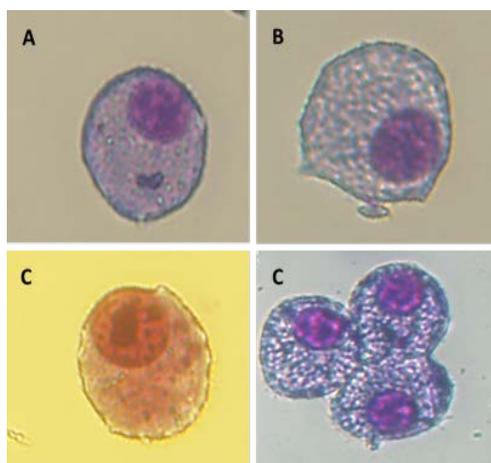


Figura 7 – Efeito da atividade do extrato de *Libidibia ferrea* (250  $\mu\text{g/mL}$ ) contra amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147) em macrófagos de linhagem J744. A. Macrófagos infectados com *L. guyanensis* – grupo controle; B. Macrófagos infectados expostos a pentamidina; C. Macrófagos infectados expostos ao extrato EpMeOH. 1000X.

## CONCLUSÕES

O extrato metanólico do epicarpo de *L. ferrea* mostrou-se o mais promissor para a utilização no tratamento da leishmaniose, apresentando atividade inibitória frente às duas espécies avaliadas, um elevado teor de compostos fenólicos e o melhor rendimento extrativo.

## CAPÍTULO II

### **ATIVIDADE *IN VITRO* ANTI-LEISHMANIA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO DO EPICARPO DE *Libidibia ferrea* (Mart Ex Tul.) LP Queiroz E ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES ATIVAS**

Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski<sup>1</sup>, Pierre Alexandre dos Santos<sup>2</sup>, Bruno Bezerra Jensen<sup>1</sup>, Fabiane Veloso Soares<sup>1</sup>, Antonia Maria Ramos Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Centro de Pesquisas em Ambiente, Saúde e Sociedade (CSAS), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, 2936, Petrópolis. CEP 69061-001. Manaus, AM. Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás. Rua 240, esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário. CEP: 74605-170. Goiânia, GO. Brasil

## RESUMO

Leishmaniose Tegumentar é uma doença parasitária endêmica nos cinco continentes, transmitido pela picada do inseto flebotomíneo, e causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Os fármacos de primeira escolha da terapia da leishmaniose são antimoniais pentavalentes tais como Glucantime® e segundos pentamidina e anfotericina B. No entanto, estes fármacos apresentam efeitos adversos. Produtos naturais derivados de plantas constituem uma fonte promissora para a busca de alternativas para o tratamento de diferentes doenças, incluindo a leishmaniose. Os extratos metanólicos dos frutos de *Libidibia ferrea* apresentou potencial anti-leishmaniose em trabalhos anteriores realizados por este grupo de pesquisa. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar as frações do extrato de metanólico quanto ao potencial anti-leishmania, citotóxica e propriedades químicas. Extrato EpMeOH de *L. ferrea* foi particionado com solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A atividade das frações obtidas a partir de extracto de *L. ferrea* foram avaliadas para a inibição do crescimento ou mortalidade promastigotas e amastigotas de *Leishmania (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e actividade citotóxica em macrófagos não infectados J774. As análises cromatográficas mostraram cinco composto na fração de 2-DCM, com presença de compostos fenólicos e terpenóides. Os resultados mostraram que a fração 2-DCM tem actividade contra *L. gyuanensis* (EC<sub>50</sub> de 38.05 µg/ml) e *L. amazonensis* (EC<sub>50</sub> de 12,77 µg/mL). A segunda fração mais ativa foi Fr3-AcOEt (EC<sub>50</sub> 83.20 µg/ml) Fr2-DCM também mostrou atividade contra amastigotas em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (EC<sub>50</sub> 64,26 µg/ml) e baixa citotoxicidade. Estes resultados podem permitir investigar a fração com maior potencial para futuros estudos de mecanismos celulares de ação dos compostos ativos.

**Palavras-chave:** *Libidibia ferrea*, produtos naturais, leishmaniose, bioensaios

## ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis is a parasitic disease endemic on five continents, transmitted vector shape, the female sandfly, through the blood meal, caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The first choice of medicines used in disease therapy are pentavalent antimonials such as Glucantime® and seconds pentamidine and amphotericin B, however, these lines have moderate therapeutic efficacy due to the presence of various adverse reactions. Natural products derived from plants constitute a promising source for the search for alternatives in the treatment of different diseases, including leishmaniasis. The methanolic extracts of the fruits of *Libidibia ferrea* presented potential anti-leishmanial on previous work conducted by this research group. So, the present study aims evaluated the fractions of the methanol extract for anti-leishmanial, cytotoxic and chemical properties. Extract EpMeOH from *Libidibia ferrea* was partitioned with solvents hexane, methylene chloride, ethyl acetate and n- butanol. The activity of the fractions obtained from *L. ferrea* extract were evaluated for growth inhibition or mortality promastigotes and amastigotes of *Leishmania (V.) guyanensis* and *L. (L.) amazonensis* and cytotoxic activity in uninfected macrophages J774. Chromatographic analyses showed five compound in fraction 2-DCM, with presence of phenolic and terpenoids. Results showed that the fraction 2-DCM has activity against *L. guyanensis* (EC<sub>50</sub> of 38.05 µg/mL) and *L. amazonensis* (EC<sub>50</sub> of 12.77 µg/mL). The second most active fraction for this species was the AcOEt fraction (EC<sub>50</sub> 83.20 µg/ml) Fraction 2-DCM also showed activity against amastigotes in macrophages infected with *L. amazonensis* (EC<sub>50</sub> 64,26 µg/ mL) and low cytotoxicity. This results can allow investigate the most promising fraction to future studies of cellular mechanisms of action of active compounds.

**Key-words:** *Libidibia ferrea*, natural products, leishmaniasis, bioassays

## INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, sendo causadas por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, e que possuem a capacidade de invadir e reproduzir-se dentro das células que fazem parte do sistema imunológico do hospedeiro infectado (Gontijo e Carvalho, 2003; Brasil, 2010). Os parasitos possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estádios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados, sendo transmitidos ao homem durante o repasto sanguíneo do vetor invertebrado (Bates, 2007).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 98 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de dois milhões de novos casos registrados por ano e mais de 15 milhões de pessoas infectadas no Mundo, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas (OMS, 2012). Em 2011 foram notificados mais de 57.000 casos da leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas, sendo no Brasil a maior concentração de casos, cerca de 40% (PAHO, 2013). É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (OMS, 2012).

No Brasil, foram identificadas as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* como as causadoras de LTA (Gontijo e Carvalho, 2003; Genaro e Reis, 2005; Guizani *et al.*, 2011).

Os tratamentos de primeira escolha para muitas formas de LTA são injeções diárias de antimoniais pentavalentes (Brasil, 2007), como o antimoniato de N-metilgucamina (Glucantime) e o estibogluconoato de Sódio (Pentostan) [Tiuman *et al.*, 2011]. Drogas como

isetionato de pentamidina, miltefosina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal, constituem opções terapêuticas aos casos de baixa eficiência dos tratamentos (OMS, 2012).

Os fármacos conhecidos e utilizados para o tratamento de leishmanioses tegumentares apresentam uma série de problemas, que incluem resistência do parasito (Torres *et al.*, 2013) e indução de efeitos colaterais (Oliveira *et al.*, 2011), que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia. Além disso, todos os fármacos que estão disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente e muitos abandonam o tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Silva-Lopez, 2010).

As plantas, por sua vez, possuem a capacidade de produção de uma diversidade de metabólitos secundários (produtos naturais) com atividades biológicas de grande interesse na sociedade humana. Até o final do século XX, estudos estimaram que cerca de 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, utilizou os produtos naturais como fonte primária nos tratamentos de doenças (Nunez-Sellés *et al.*, 2007). Ao contrário dos medicamentos convencionais, os fitoterápicos são misturas de constituintes, ao menos em parte delas, sem caracterização química, e por serem constituídos por uma mistura fornecem vantagem terapêutica, pois os componentes desconhecidos podem combinar entre si e com aqueles já determinados de maneira sinérgica resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido puro (OMS, 2008).

A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea*, nativa da região Amazônica, apresenta ampla distribuição, propriedades econômicas e também farmacológicas, sendo empregada desde a produção de madeira, quanto na arborização de ruas, avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas (Lorenzi, 2002).

Estudos químicos e farmacológicos de extratos obtidos de *L. ferrea* tem demonstrado seu potencial biológico anti-inflamatório (Carvalho *et al.* 1996), bactericida, agente

hipoglicemiante e antioxidante (Batubara *et. al*, 2009), e também mostrou inibição do crescimento *in vitro* de *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010).

Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes para o tratamento da Leishmaniose, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos da *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas. Além disso, novas formas de aplicação devem ser consideradas para o desenvolvimento de métodos de veiculação de fármacos. Pretende-se com este estudo contribuir para a obtenção de formulações com base fitoterápica, utilizando extratos ou frações de *L. ferrea*, ou mesmo de um fármaco que possa ser indicado por apresentar potencial atividade no combate a esta importante doença negligenciada, principalmente no Brasil.

## **METODOLOGIA**

**Coleta do material vegetal:** As partes vegetais (folhas, galhos e epicarpo) foram coletadas de um indivíduo de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz presente em uma propriedade particular do bairro Parque Dez de Novembro, Manaus, Amazonas, no período de frutificação da espécie (junho). Exsicata preparada foi identificada pelo pesquisador Dr. Mike Hopkins, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, e depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o número de identificação 246150.

**Preparação dos extratos:** O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada, com temperatura inferior a 45 °C. Após a secagem, as partes foram moídas e pulverizadas em moinho de facas. Após a pulverização, os materiais foram extraídos com hexano e metanol (VETEC®). Foram realizadas três extrações com cada solvente utilizando banho de

ultrassom por 20 minutos, em cada extração. O volume de cada solvente utilizado variou conforme a quantidade de material vegetal, mantendo a proporção de 250 mL de solvente para cada 100 g de material pulverizado, em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seco à temperatura ambiente. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (Büchi).

### **Fracionamento do Extrato Metanólico de *Libidibia ferrea***

Para realizar as partições, 50 g do extrato metanólico foi solubilizada em 400 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1) e extraído três vezes (400 mL de solvente, cada vez) com cada um dos solventes utilizados na partição. As partições foram realizadas com Hexano, DCM, AcOEt e *n* - BuOH. Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para a avaliação da atividade leishmanicida. Durante o procedimento de partição, ocorreu a formação de uma emulsão com uma fase intermediária na extração com hexano, diclorometano e acetato de etila, e mesmo após repouso, persistiu.

### **Abordagem fitoquímica**

As frações obtidas foram analisados por CCDC, empregando-se diferentes sistemas de eluição, e reveladores físicos (luz UV) e químicos (anisaldeído sulfúrico, iodo ressublimado, Dragendorff e cloreto férrico). Esta análise teve por objetivo uma avaliação preliminar da presença das classes de substâncias presentes nos extratos e frações, como terpenos e esteroides, alcaloides e compostos fenólicos, tais como os flavonoides.

## Dosagem de fenólicos totais e flavonoides totais

Para a dosagem de fenólicos totais, as frações foram diluídas em Metanol (Prolabo) ou Isopropanol (Prolabo) e o volume de 1000 µL das amostras (1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) foram diluídas em 2000 µL of trietanolamina 5% e 1000 µL cloreto férrico 0,165%. A leitura da absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (510 nm), e as reações foram realizadas em triplicata. Curva padrão prévia foi realizada com concentrações conhecidas de pirogalol (Merk). Para a dosagem de flavonoides totais, as frações foram diluídos em Metanol ou Isopropanol, e o volume de 500 µL das amostras (1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) foram diluídas em 100 µL de acetato de sódio 1M e 100 µL cloreto de alumínio 10%. A leitura da absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (415 nm) e as reações foram realizadas em triplicata. Curva padrão prévia foi realizada com concentrações conhecidas de naringinina e quercetina (Merk). Os resultados são expressos em abundância relativa porcentual e calculados pela equação:

$$[\text{Pyrogalol/ Quercetina/ Naringinina}]_{\text{eq}} = (|\Delta\text{ABS}| - a) / b \times 100$$

*a = coeficiente linear da curva de pyrogalol/Quercetina/naringinina*

*b = coeficiente angular da curva de pirogalol/Quercetina/naringinina*

## Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de

**Massas:** espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas UltrOTOF (Bruker Daltonics®) com ionização por electrospray (ESI+) e analisador do tipo QqTOF (quadrupolo e tempo de voo em sequência). Separação ocorreu por eluição em coluna Shim-pack XR-ODS 2.0mm i.d x 50mm. Condições de eluição: Bomba A(H<sub>2</sub>O 0,1% ácido

formico) e B (acetonitrila 0,1% ácido fórmico): 0-25 minutos B vai de 5 a 22%; 25-30 minutos B vai de 22 a 100%; 30-35 min B vai de 100 a 5%. Fluxo de eluição de 0,4 mL/min e injeção de 2 µL.

**Analises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear:** espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetros: Bruker 300 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$ . Os deslocamento químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os solventes utilizados foram  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### **Ensaio anti-leishmania *in vitro***

**Cultivo celular e preparo de massa parasitária:** foram utilizadas as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147), mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS, INPA. As forma promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* para utilização nos bioensaios *in vitro* foram mantidas e cultivadas em meio Drosophila Medium Schneider completo (Sigma), suplementado com 10% de SFBi e gentamicina (40 mg/mL), e mantidos em estufa a 25 °C, de acordo com JAFFE et al. (1984). Foi realizada curva de crescimento previamente à realização dos bioensaios. Os macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em meio RPMI-1640 (Himedia<sup>®</sup>) em garrafas de cultura em estufa a 37 °C.

Os macrófagos utilizados da linhagem MJ77 foram mantidos em meio RPMI-1640 (Himedia) em garrafas de cultura em estufa a 37° C. A cada dois dias verifica-se o estado

das células e feito o repique retirando-se o meio RPMI antigo, lavando as células com RPMI com suplementação de 10% de SFBi (Biosul). Após a lavagem complementa-se o poço com RPMI com 10% de SFBi.

**Determinação da atividade anti-leishmania em promastigotas:** As atividades anti-leishmania das frações do extrato do epicarpo foram avaliadas pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Antes de cada experimento, foram observadas a motilidade flagelar e a morfologia geral dos parasitos. Para a realização do bioensaios, as formas promastigotas em fase logarítmica tardia foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos, lavadas em solução salina estéril, diluídas e contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para obter a concentração parasitária de  $1,0 \times 10^6$  células/mL. As frações foram diluídas em meio Schneider sem adição de SFBi e filtrados em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  em ambiente estéril. As amostras foram diluídas primeiramente em dimetil-sulfóxido (DMSO – Vetec), (3% v/v) e sequentemente no meio de cultura. As frações foram avaliadas nas concentrações de 250 a 15,62  $\mu\text{g/mL}$ , os flavonoides quercetina e naringinina foram avaliados nas concentrações inferiores a 30  $\mu\text{g/mL}$ . Pentamidina (Pentacarinat®) foi utilizada como controle positivo na concentração máxima de 10  $\mu\text{g/mL}$  e mínima de 0,0625  $\mu\text{g/mL}$  e DMSO (4% v/v) foi utilizado como controle negativo. A atividade das amostras foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* após incubação na presença das mesmas nos períodos de 24, 48 e 72 horas, na temperatura de 25 °C em estufa. Os bioensaios foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes. A média do número de células vivas foi utilizada para calcular por regressão linear e calcular os valores de a  $EC_{50}$  (concentração efetiva para 50% dos parasitas). O valor da  $CE_{50}$  é utilizado para expressar os

resultados das atividades das amostras avaliadas e selecionar as que se apresentam mais ativas para estudos posteriores.

**Avaliação da atividade citotóxica em Macrófagos:** macrófagos da linhagem J774 ( $10^5$  células/mL) foram cultivados previamente em placa de polietileno de 24 poços contendo meio RPMI 1640 com a suplementação de 10% de SFBi (Biosul), durante 24 horas a 37 °C. Após este período, houve a troca do meio com a adição de concentrações das frações do Extrato EpMeOH de *L. ferrea*. A incubação dos macrófagos foi em estufa a 37 °C, por 48 horas na presença das amostras. Após este período foi adicionado 20 µL do reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazolium) (Roche®) e após 4 horas de incubação foram adicionados 100 µL de solução de solubilização. Os macrófagos foram incubados por mais 12 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras colorimétricas em espectrofotômetro (Bio-Tek®), utilizando os comprimentos de onda de 590 nm. O cálculo para a obtenção do valor de CE<sub>50</sub> foi por regressão linear. A avaliação ocorreu também pela contagem de macrófagos viáveis utilizando o reagente Azul de Tripán, e visualização em microscópio óptico.

**Avaliação da atividade anti-leishmania em amastigotas intracelulares:** macrófagos da linhagem J774 foram incubados em placa de 24 poços ( $10^5$  células/mL), em meio RPMI-1640 completo a 37°C, por 48 horas. Após este período, os macrófagos ( $1,0 \times 10^5$  células/mL) foram infectados com  $10^6$  promastigotas/mL (1:10 célula/parasita) por, no máximo, quatro horas. As espécies de *Leishmania* avaliadas foram *L. (V). guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Em seguida, os poços foram lavados com RPMI para a remoção dos promastigotas não interiorizados. Os macrófagos infectados com promastigotas foram incubados na presença das frações de *L. ferrea* que apresentaram maior potencial anti-

leishmania contra promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e ausência de atividade citotóxica. Após 48 horas de incubação em estufa a 37 °C, os poços foram lavados com solução salina, as lamínulas de vidro foram removidas, e as células infectadas fixadas e coradas utilizando método panótico adaptado para testes utilizando macrófagos. Foram avaliados o número de macrófagos infectados (200 macrófagos por replicata) e o número de amastigotas por macrófagos. A avaliação destes parâmetros foi realizada por observação em microscópio óptico. Pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>) foi utilizada como controle positivo do experimento, enquanto o controle negativo correspondeu às células infectadas com os parasitos na presença de DMSO (3% v/v). O valor de CE<sub>50</sub> para a forma amastigota foi calculado utilizando regressão linear.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Preparação e análise química das frações**

O potencial farmacológico dos produtos naturais é frequentemente guiado por ensaios biológicos, sendo de extrema importância a busca por alternativas no tratamento de doenças negligenciadas (Ioset, 2008). Assim, estudos prévios realizados com extratos obtidos da espécie *Libidibia ferrea* (Fabaceae: “Caesalpinoideae”) quanto ao seu potencial contra espécies de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010) instigaram a continuidade dos estudos dos produtos naturais de *L. ferrea*, aprofundando aspectos químicos de extratos e frações da espécie e investigando sua ação antileishmania em bioensaios *in vitro* e também *in vivo*.

As frações obtidas (tabela 7) foram analisadas por CCDC, empregando-se diferentes sistemas de eluição, e reveladores físicos (luz UV) e químicos (anisaldeído sulfúrico, iodo

ressublimado, Dragendorff e cloreto férrico). Esta análise teve por objetivo uma avaliação preliminar da presença das classes de substâncias presentes nos extratos e frações, como terpenos e esteroides, alcaloides e compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As fases Hex e DCM da partição do extrato metanólico do epicarpo foram melhor eluídas no sistema DCM: AcOEt (1:1 v/v). Apenas a Fr1-Hex e a Fr2- DCM apresentaram manchas azuladas fluorescentes, as demais possuíam manchas vermelhas fluorescentes e rosas opacas. A Fr1-Hex da partição do extrato metanólico do epicarpo revelou um perfil mais similar à dos extratos de baixa polaridade, com manchas possuindo um Rf superior a 0,7 e coloração predominante roxa. As frações DCM, AcOET e BuOH obtidas da partição já mostraram um perfil com manchas mais amareladas e muito rastro na eluição . Estes resultados sugerem que os terpenos e esteroides presentes nos extratos metanólicos ficaram retidos na fração hexano majoritariamente, e em menor quantidade nas frações DCM, AcOEt e BuOH.

Tabela 7 – Massa das frações obtidas da partição do extrato metanólico do epicarpo de *Libidibia ferrea*

<b>Extrato</b>	<b>Material submetido à partição</b>	<b>Fr Hexano</b>	<b>Fr DCM</b>	<b>Fr AcOEt</b>	<b>Fr BuOH</b>
<b>Extrato Epicarpo MeOH</b>	50 g	1,12 g	4,4 g	26,8 g	5,7 g

Entre as fases da partição, a fração BuOH apresentou maior abundância de compostos fenólicos – 6,36% (tabela 8) – o que pode ser decorrente da maior interação destas substâncias, que muitas vezes aparecem na forma glicosilada, com solvente de maior

polaridade. Porém, a fase AcOEt foi a que apresentou a maior abundância relativa de flavonoides no extrato.

Tabela 8 – Determinação da abundância relativa de fenólicos e flavonoides presentes nas frações de *Libidibia ferrea*

Amostras	% Fenólicos totais	% Flavonoides	
		(Quercetina)	(Naringenina)
Fr Hex	1,283 ± 0,29	0,645 ± 0,09	0,2880 ± 0,25
Fr DCM	3,481 ± 0,78	1,826 ± 0,40	1,6159 ± 0,61
Fr AcOET	5,310 ± 0,91	3,103 ± 0,38	2,5895 ± 0,92
Fr BUOH	6,336 ± 0,57	1,606 ± 0,11	1,4489 ± 0,83

As análises por RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz foram realizadas para a fração DCM obtida da partição do extrato metanólico do epicarpo de *L. ferrea*.

No processo de obtenção do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração DCM, utilizou-se TMS como padrão de referência interna e  $\text{CDCl}_3$  como solvente. Observa-se no espectro a presença dos sinais referentes  $\sigma$  7,25 ppm do  $\text{CDCl}_3$  e 0,0 ppm do TMS.

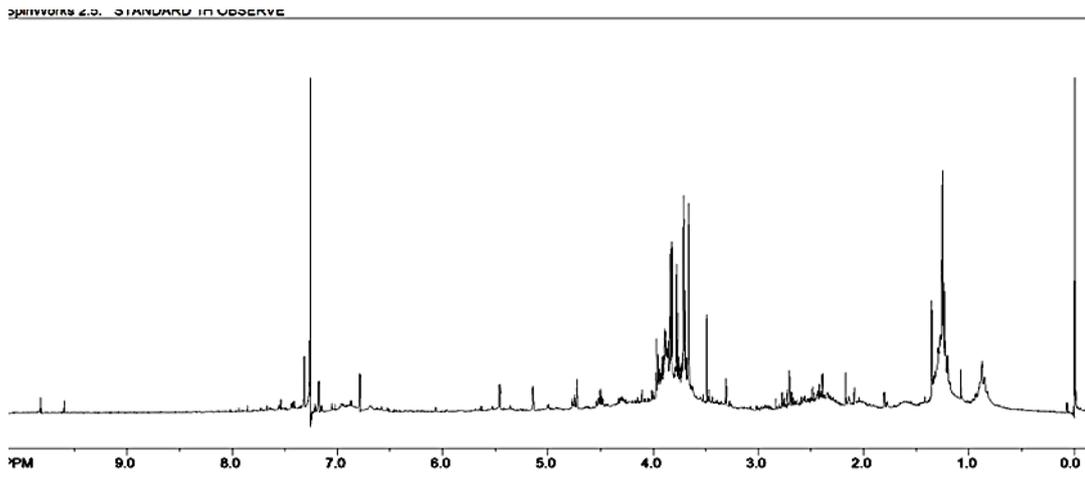


Figura 8 – Espectro  $^1\text{H}$  (300 MHz) da Fração DCM da partição do Extrato Metanólico do Epicarpo de *Libidibia ferrea*

A fração DCM, que mostrou-se nas análises por CCDC e CLAE (figura 14) como uma mistura de substâncias, apresentou sinais discretos na região de  $\sigma$  7,0 – 8,0 ppm (figura 13), região característica de sinais de hidrogênios aromáticos. A presença de compostos fenólicos nesta fração indica que seria esperado a visualização de sinais na região de aromáticos. Porém, por tratar-se de uma análise de uma mistura, os sinais podem ter ficado menos intensos devido a maior quantidade de hidrogênios em outros grupos funcionais, que podem estar em maior abundância na fração.

O espectro apresenta sinais na região de  $\sigma$  3,6 – 4,0 ppm, região característica de hidrogênios ligados à carbonos carbinólicos ou hidrogênio oleofínicos. Os carbonos carbinólicos podem indicar a presença de carboidratos, possivelmente de fenólicos glicosilados, e sinal em  $\sigma$  1,25 característico de alcanos alifáticos. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta simpletos  $\delta\text{H}$  em região mais protegida (0,7 – 1,2) que pode ser atribuído a seis grupos metilas de metabólitos terpenoides. A fração DCM apresentou sinais característicos dos grupos que já haviam sido descrito em ambos os trabalhos com o extrato bruto de *L. ferrea*.

O cromatograma da fração DCM (figura 14) mostrou a presença de cinco substâncias, cujos espectros de massas foram obtidos. Os resultados apontam a presença do ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico com  $m/z$  457,2766, o qual já foi isolado previamente de outras espécies de Fabaceae e apresenta propriedades anti-maláricas (Ziegler *et al*, 2004).

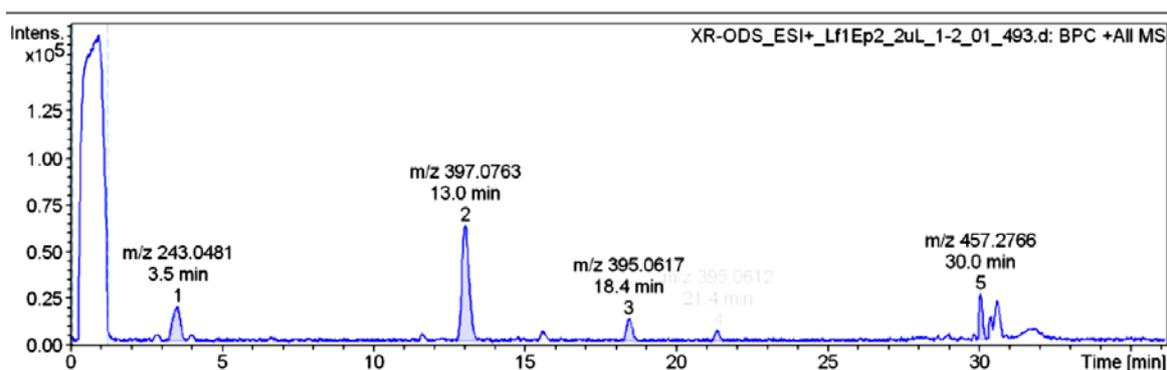


Figura 9 Cromatograma da Fr-DCM e massa/carga ( $m/z$ ) das substâncias eluídas nas condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência

A análise do espectro de  $^1\text{H}$  da fração AcOEt apresentou com a maior intensidade os sinais característicos do solvente AcOEt, que foi utilizado para a extração.

### Atividade *in vitro* de extratos contra promastigotas

A fração DCM apresentou alta atividade anti-leishmania contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) (figura 15 e figura 16), apresentando valores de  $\text{EC}_{50}$  de 12,77  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 9). A segunda fração mais ativa para esta espécie foi a fração AcOEt ( $\text{EC}_{50}$  154,17  $\mu\text{g/mL}$ ), a qual também apresentou maior atividade após 48 horas de incubação. A fração Hexano do extrato metanólico do epicarpo não apresentou atividade inibitória contra as espécies *L. (L.) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) (figura

35) assim como a Fração BuOH. Este resultado pode estar relacionado com o mesmo efeito obtido com a avaliação do extrato hexano do epicarpo (FALCÃO, 2010), uma vez que ambas as amostras foram extraídas com o solvente apolar hexano.

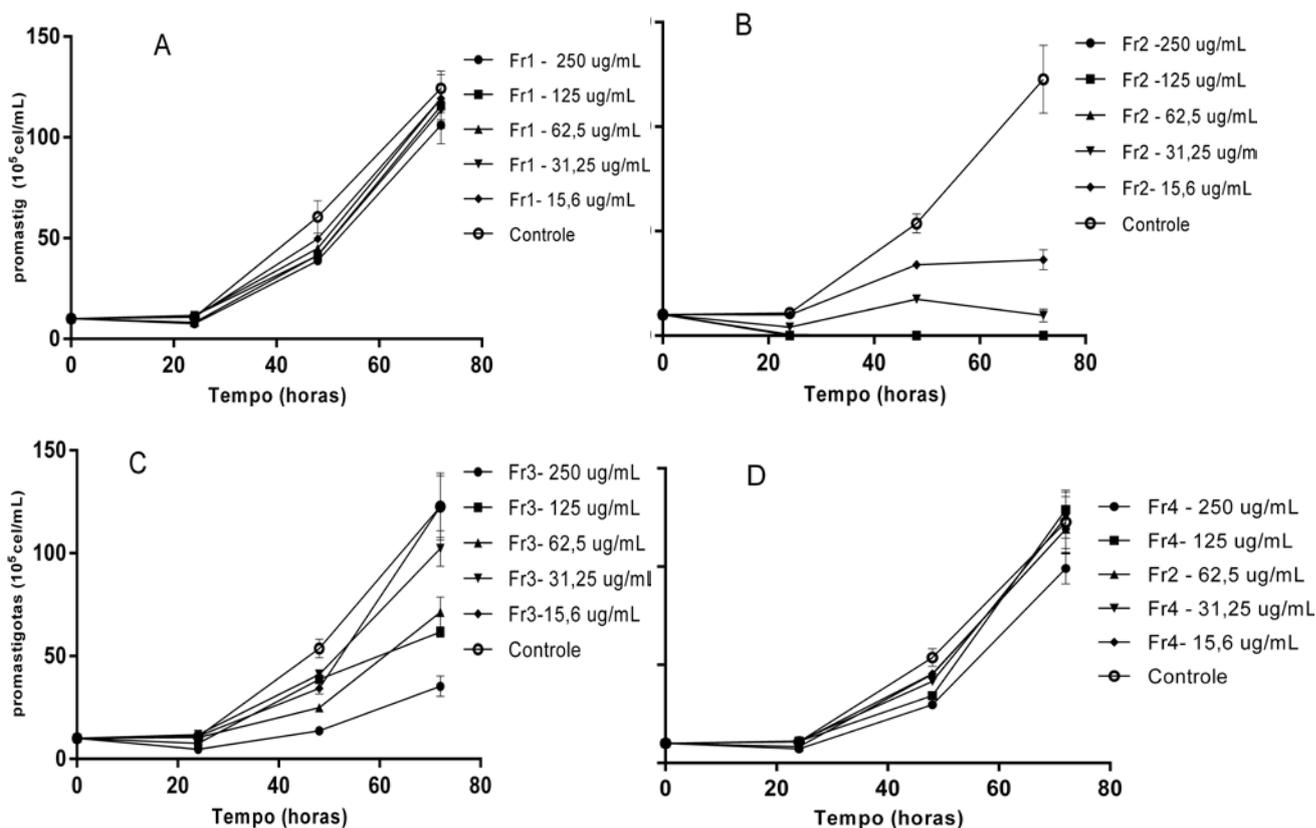


Figura 10 Atividade anti-leishmania de frações de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584). A- Fração 1-Hex; B – Fração 2-DCM; C – Fração 3-AcOEt; D – Fração 4-BuOH. Os parasitas ( $10^6$  cell/mL) foram cultivados em diferentes concentrações 25 °C e avaliados em 24, 48 e 72 horas. Pentamidina (Pentacarinat®) [10  $\mu$ g/mL] foi usado como controle positivo e o controle negativo é considerado a concentração de parasitas em meio Schneider.

Quando analisados os resultados da atividade das frações frente a de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), a fração mais ativa foi a fração DCM (figura 16), com  $EC_{50}$  27,98  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando atividade cumulativa, reduzindo a concentração de promastigotas viáveis até 72 horas de incubação. A segunda fração mais ativa foi a Fr3-AcOEt ( $EC_{50}$  93,79  $\mu\text{g/mL}$ ). A fração BuOH apresentou baixa atividade, com valores de  $EC_{50}$  acima de 100  $\mu\text{g/mL}$  nos intervalos de 24 e 48 horas de incubação.

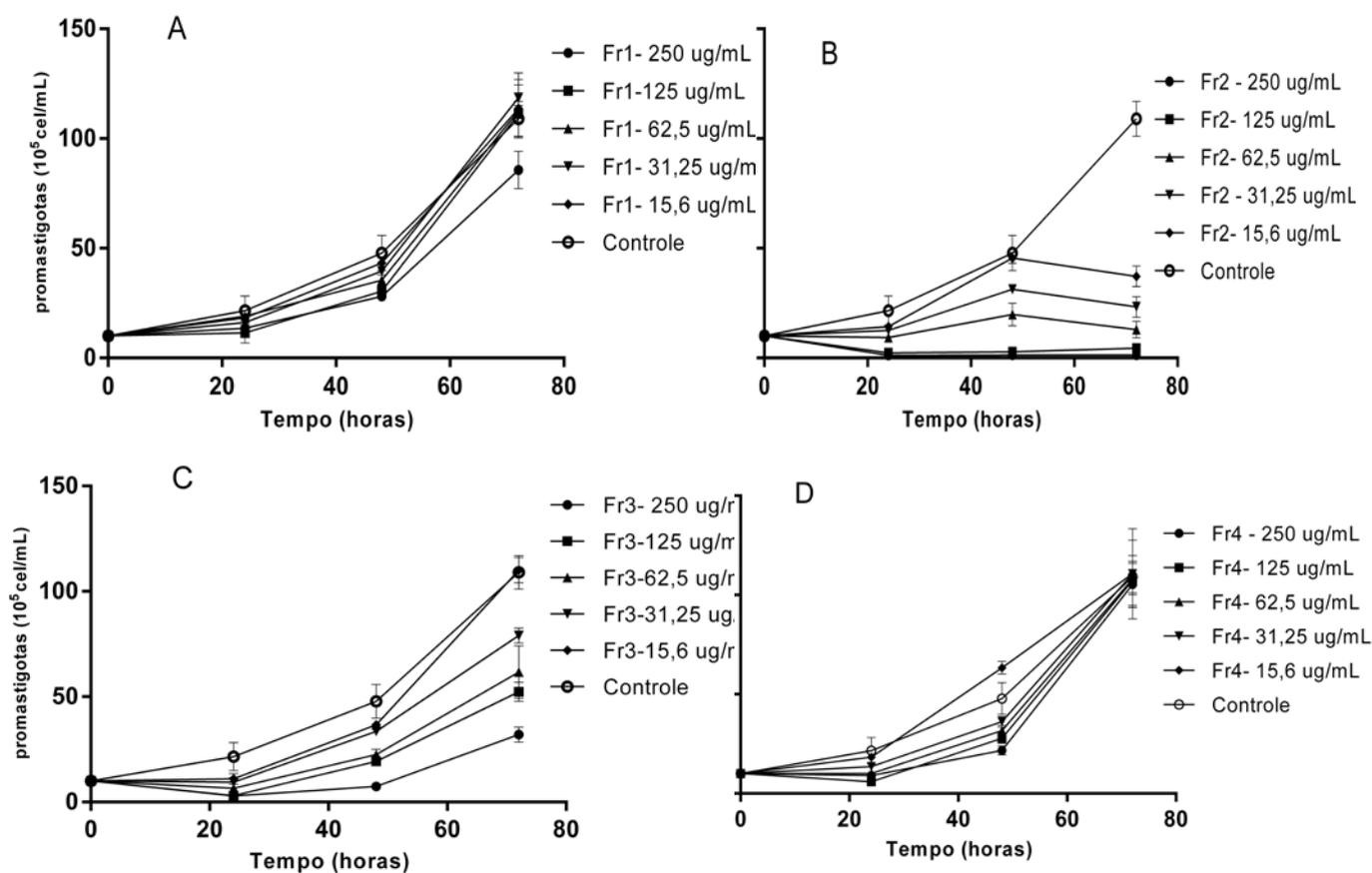


Figura 11 . Atividade anti-leishmania dos extratos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). A- Fração 1-Hex; B – Fração 2-DCM; C – Fração 3-AcOEt; D – Fração 4-BuOH. Os parasitas ( $10^6$  cell/mL) foram cultivados em diferentes concentrações 25 °C e avaliados em 24, 48 e 72 horas. Pentamidina (Pentacarinat®) [10  $\mu\text{g/mL}$ ] foi usado como controle positivo e o controle negativo é considerada a concentração de parasitas em meio Schneider.

A atividade contra *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147) está apresentada na figura 17. As frações DCM e AcOEt foram as mais promissoras, verificando-se que a fração DCM apresenta valores menores de concentração efetiva ( $EC_{50}$  38,05  $\mu\text{g/mL}$ ). As frações Hex e BuOH não apresentaram atividade com *L. (V.) guyanensis*.

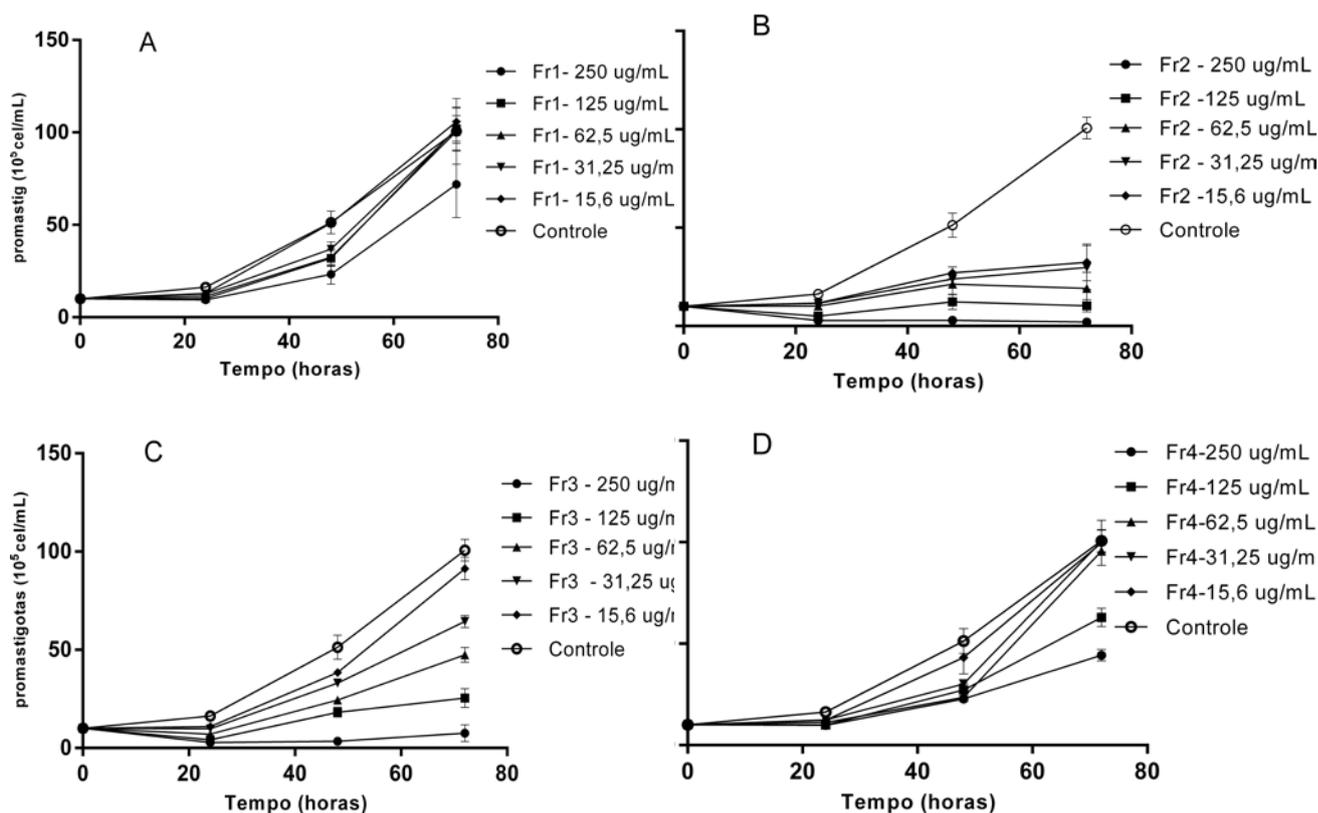


Figura 12 Atividade anti-leishmania dos extratos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz frente a promastigotas *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147). A- Fração 1-Hex; B – Fração 2-DCM; C – Fração 3-AcOEt; D – Fração 4-BuOH. Os parasitas ( $10^6$  cell/mL) foram cultivados em diferentes concentrações 25 °C e avaliados em 24, 48 e 72 horas. Pentamidina (Pentacarinat®) [10  $\mu\text{g/mL}$ ] foi usado como controle positivo e o controle negativo é considerado a concentração de parasitas em meio Schneider.

Os resultados promissores verificados pela ação da fração DCM instigaram avaliar outros aspectos dos parasitas frente a esta fração, tais como a morfologia dos promastigotas

após o contato com a fração DCM e a viabilidade dos parasitas para crescer em meio de cultura na ausência da fração, repetindo-se assim três vezes o bioensaio. O número de parasitas nos poços contendo as diluições da fração DCM apresentou a mesma inibição total nos três poços com maior concentração e um baixo crescimento nas demais concentrações.

Observou-se que em amostras da cultura dos poços do teste de promastigotas de *Leishmania* contendo a fração DCM apareceram formas celulares arredondadas e de tamanho mais reduzido, demonstrando uma possível alteração morfológica nas células. Quando uma alíquota de 30 µL dos poços contendo 250 µg/mL da fração DCM foram inoculadas em garrafas com meio de cultura Schneider e RPMI (contendo 10% de SFB), após a incubação por 48 horas a 25 °C, verificou-se que os meios permaneciam estéreis, não apresentando crescimento celular parasitário ou de outros possíveis micro-organismos contaminantes.

A fração DCM apresentou-se como a mais promissora entre as frações avaliadas contra as formas promastigotas, e, assim sendo foi avaliada quanto ao seu potencial citotóxico e inibitório contra as formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584). A fração DCM apresentou baixa atividade citotóxica, possuindo uma atividade baixa na maior concentração testada e uma atividade maior numericamente, mas não estatisticamente na segunda concentração testada. Este mesmo efeito foi observado na determinação colorimétrica (MTT) e por contagem de células viáveis por microscopia óptica. O valor de EC<sub>50</sub> calculado para a atividade citotóxica da fração DCM foi de 493,02 µg/mL (tabela 9). Este valor de concentração efetiva é bem superior à concentração ativa contra promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis* apresentada por esta fração.

Quando a fração DCM foi avaliada frente às formas amastigotas em macrófagos infectados (figura 18), foi observada uma maior atividade anti-leishmania contra *L.*

*amazonensis*, apresentando EC<sub>50</sub> de 64,26 µg/mL. Porém, os macrófagos também mostraram um índice maior de infecção por *L. guyanensis* quando comparado com o índice de infecção de *L. amazonensis*, corroborando com trabalhos que mostram uma maior resistência da espécie *L. guyanensis* a diferentes substâncias naturais e sintéticas.

Os resultados aqui discutidos mostram que a fração DCM é promissora para futuros estudos químicos e farmacológicos, pois mostrou atividade *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, mas não apresentou citotoxicidade nas concentrações efetivas. Além disso, as análises químicas mostraram que a fração consiste em uma mistura de apenas cinco metabólitos secundários, podendo ser futuramente isolados para estudos farmacológicos mais específicos, como atividade inibitória em enzimas específicas e conhecidas de espécies de *Leishmania*.

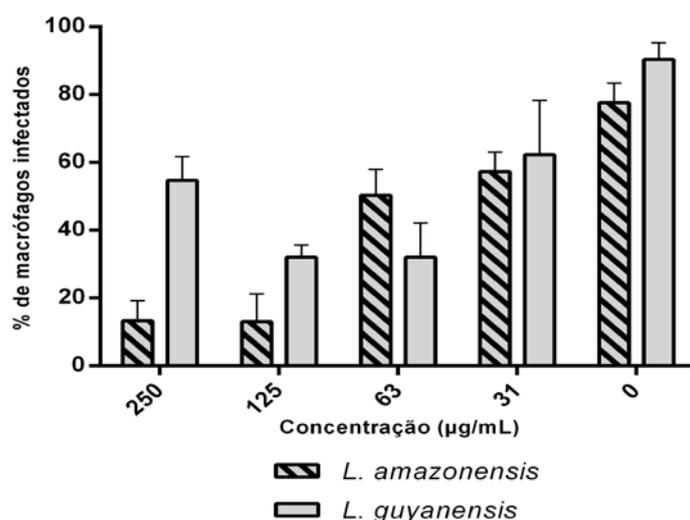


Figura 13– Atividade da Fr2-DCM frente a formas amastigotas interiorizadas em macrófagos da linhagem J774. Espécies: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/95/M4147). Incubação 48 horas a 25 °C.

Tabela 9 – Valores de EC<sub>50</sub> calculados por regressão linear modelo Deming para as formas promastigotas das espécies avaliadas na presença das frações do EpMeOH de *Libidibia ferrea* e para os padrões de flavonoides e do fármaco Pentamidina.

Amostras	EC <sub>50</sub> [µg/mL]			
	<i>L. amazonensis</i> (IM 5584)	<i>L. amazonensis</i> (PH8)	<i>L. guyanensis</i>	Macrofagos J774
Fr1- Hex	> 250	> 250	> 250	--
Fr2 - DCM	12,77 ± 1,01	27,98 ± 1,51	38,05 ± 1,64	493,02 ± 8,34
Fr3 - AcOEt	154,17 ± 0,68	93,79 ± 1,24	83,22 ± 0,94	237,98 ± 17,15
Fr4 - BuOH	> 250	171,23 ± 1,62	> 250	--
Quercetina	16,94 ± 0,22	--*	14,91 ± 0,19	--
Naringenina	0,26 ± 0,21	--*	0,74 ± 0,15	--
Pentamidina	1,62 ± 0,10	2,93 ± 0,82	1,25 ± 0,07	--

Os macrófagos infectados com formas amastigotas, tanto de *L. amazonensis* quanto *L. guyanensis* quando expostos a Fr-DCM mostraram a produção de pigmentos referentes a hemossiderina (figura 19), o que pode estar associado a eventos de inflamação ou metabolismo do ferro alterado nestas condições (Kaye e Scott, 2011).

Os valores de EC<sub>50</sub> encontrados para esta fração foram inferiores a muitos produtos naturais relatados até o momento (Tempone *et al*, 2005, Sen e Chatterje, 2011; Singh *et al*, 2014). Os resultados mostram que a fração DCM possui atividade promissora contra *Leishmania* tanto na forma promastigota quanto amastigota. A ausência de citotoxicidade na maior concentração avaliada também é um fator importante a ser considerado para estudos futuros.

As análises químicas apontam a presença de fenólicos e terpenos, entre estes o triterpeno ácido betulínico. Porém, estudos que avaliaram a atividade do ácido betulínico contra *L. donovani* e *L. braziliensis* e *L. amazonensis* mostraram valores de EC<sub>50</sub> acima de 50 µg/mL (Dominguez-Carmona *et al*, 2010). Entretanto, esta substância é conhecida pelo seu

potencial contra protozoários do gênero *Plasmodium*, causadores da malária humana (Ziegler *et al.*, 2004).

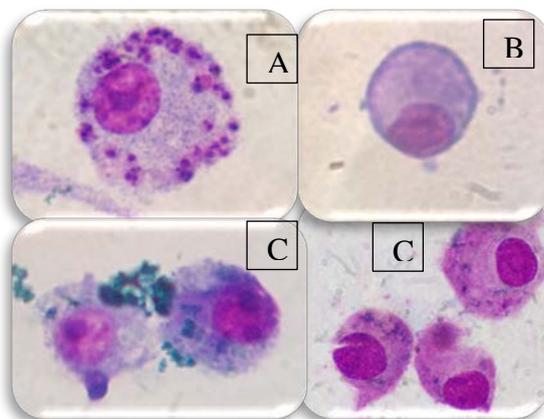


Figura 19 – Efeito da atividade da fração DCM obtida de *L. ferrea* (250 µg/mL) contra formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) em macrófagos de linhagem J744. A. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* – grupo controle; B. Macrófagos infectados expostos a pentamidina; C. Macrófagos infectados expostos ao Fr2. 1000X.

## CONCLUSÕES

A fração DCM obtida do extrato metanólico do epicarpo apresentou inibição contra as espécies de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* em baixas concentrações. Foi a fração mais promissora, mostrando também atividade nas formas intracelulares e baixa citotoxicidade em macrófagos. Os estudos químicos indicaram a presença do ácido betulínico na sua composição.

### CAPÍTULO III

#### **EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO DE FORMULAÇÕES CONTENDO PENTAMIDINA EM HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski<sup>1</sup>, Iryna Grafova<sup>2</sup>, Bruno Bezerra Jensen<sup>1</sup>,  
Maricleide Farias Naiff<sup>1</sup>, Maurizio Avella<sup>3</sup>, Gennaro Gentile<sup>3</sup>, Andriy Grafov<sup>2</sup>, Antonia  
Maria Ramos Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Av. André Araújo, 2936, Petrópolis. CEP 69067-375, Manaus - AM. Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Química Inorgânica, Instituto de Química. Universidade de Helsinki, A.I.Virtasen aukio 1, 00014, Helsinki, Finlândia.

<sup>3</sup>Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros (ICTP) - CNR, Via Campi Flegrei, 34, 80078, Pozzuoli, Napole, Itália.

## RESUMO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a eficiência de formulações tópicas contendo Pentamidina no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. Foram utilizados Hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal, infectados com de *Leishmania (L.) amazonensis*. Após cerca de três semanas, com o aparecimento das lesões, os animais foram separados em grupos para o recebimento das diferentes emulsões hidratantes ou anidras. Cada grupo recebeu um tipo de tratamento tópico (exceto os grupos controle), na região do focinho, onde ocorreu as lesões causada por *L. amazonensis*. Foram registradas imagens das lesões para observação do aspecto clínico e aferido o volume total da região lesionada. Após o período de tratamento, foram avaliados aspectos histológicos por microscopia óptica e eletrônica de transmissão e cultura dos fragmentos da região lesionada em todos os grupos. Os resultados mostraram que a formulação hidratante ACE5AU, contendo óleos vegetais, e 10% de pentamidina mostrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no volume da lesão após 20 dias do fim do tratamento tópico, porém ACE5A apresentou a maior redução no número de parasitas nas impressões das lesões em lâminas em relação ao grupo controle. Os cremes anidros não apresentaram diferença estatística no número de amastigotas nas impressões em lâminas, porém os grupos tratados mostraram diferença estatística após 10 dias do fim do tratamento tópico, em relação ao grupo controle quanto ao volume total da lesão. Os resultados da análise por TEM mostraram a formação de vacúolos parasitóforos contendo formas amastigotas em todas as formas de tratamento. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de estudos em tempo de tratamento mais prolongado para avaliar os efeitos a longo prazo do tratamento tópico.

**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea, tratamento tópico, pentamidina

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the efficacious of topical formulations containing pentamidine (Lomidine®) in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. Golden hamsters were used (*Mesocricetus auratus*) as an animal experimental model infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. After three weeks of inoculation, with primary lesions, the animals were grouped into six number to receive different formulations (anhydrous creams and hydrating emulsions) containing Pentamidine. Each group received a type of topical treatment (except the control group) in snout, area of the lesions caused by *L. amazonensis*. Images of lesions were recorded for observation of the clinical aspect and measured the total volume of the lesion region. After the treatment were evaluated by histology, transmission electron microscopy (TEM) and biopsy cultivation of the lesions fragments in all experimental groups. The results showed that the moisturizing formulation ACE5AU (containing 10% of pentamidine and usnic acid) showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in lesion volume after 20 days of the end of topical treatment, but ACE5A (containing 10% of pentamidine) showed the greatest reduction in the number of parasites in the impressions of lesions on slides in the control group. Anhydrous cream showed no statistical difference in the number of amastigotes in imprints of slides, but the treated groups showed statistically significant differences after 10 days of the end of topical treatment in the control group, for total lesion volume. The results of analysis by TEM showed the formation of parasitophorous vacuoles containing amastigotes in all forms of treatment but with morphological change in the group treated with creams containing pentamidine. The results show the necessity of more prolonged topical treatments for optimal effectiveness of treatment.

**Key words:** Cutaneous Leishmaniasis, topical treatment, pentamidine isethionate, *Leishmania amazonensis*

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária inflamatória crônica causada por parasitas obrigatoriamente intracelulares do gênero *Leishmania*, capaz de acometer diferentes tipos de tecidos dependendo da espécie envolvida (Murray *et al.*, 1997; Souza, 2004). O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial (Soares-Bezerra *et al.*, 2004). O tratamento das leishmanioses ainda permanece muito restrito e depende da forma clínica com que a doença se manifesta (tegumentar ou visceral). Os antimoniais pentavalentes, como Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e o Estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), permanecem como as drogas de primeira linha para o tratamento das leishmanioses há mais de 50 anos (Almeida e Santos, 2011), porém estão fortemente associados a diversos efeitos colaterais e alta toxicidade. O tratamento com antimoniais é demorado e administrado por via parenteral, havendo elevado número de desistências ao tratamento, favorecendo o aparecimento de cepas resistentes.

Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a Pentamidina, Anfotericina B, a Paromomicina e o Miltefosine (Rath *et al.*, 2003). A utilização destes medicamentos se dá principalmente em casos de resistência, alergia ou ineficácia ao tratamento com os antimoniais pentavalentes. No entanto, cada uma destas terapias apresenta limitações importantes, incluindo a administração parentérica a longo prazo, efeitos tóxicos secundários, alto custo em países endêmicos, e um elevado número de casos de resistência,

predominantemente associadas à coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Croft et al., 2006).

As pentamidinas são diamidinas aromáticas que vêm sendo utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da LT em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano (Basselin *et al.*, 1997). São comercializadas para uso em humanos nas seguintes formulações: Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato). A descoberta da atividade antiprotozoária das diamidinas foi consequente a procura por compostos hipoglicemiantes que pudessem comprometer o metabolismo energético de parasitas. Atualmente, é comercializada para uso humano apenas sob a forma liofilizada de isotionato de pentamidina, em frascos contendo 300 mg do sal. O mecanismo de ação da pentamidina ocorre por inibição de diferentes processos celulares, ainda não totalmente elucidados. O isotionato de pentamidina é completamente absorvido após a administração parenteral (Moskowitz e Kurban, 1999).

Estudos pioneiros com formulações tópicas aplicadas ao tratamento da leishmaniose foram realizados por El-On et al. (1986), utilizando preparações tópicas do antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, a paromomicina, usando 15% de sulfato de paromomicina e 12% de cloreto de metilbenzetonio em uma base hidrofóbica no tratamento de LC causada por *L. (L.) major*. Os resultados positivos encontrados neste estudo, o qual apresentou inibição parasitária após 20 dias de tratamento tópico, estimulou estudos com esta preparação em outras espécies de *Leishmania*, obtendo resultados positivos também no tratamento da LC causada por *L. braziliensis* (El-On, *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de formulações tópicas seria um método alternativo para o tratamento da leishmaniose cutânea. Embora o transporte transdérmico de fármacos tenha muitas vantagens sobre outras vias de administração, este ainda apresenta problemas a serem

investigados, como a baixa penetração da maioria dos compostos através da pele humana (Rossi-Bergmann, 2011).

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento de formulações tópicas contendo pentamidina em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*.

## **METODOLOGIA**

### **Origem e Manutenção dos parasitas**

Utilizou-se a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2006/IM5584), mantida e criopreservada no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Saúde Ambiente e Sociedade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os parasitas são cultivados em meio NNN e a cultura expandida em meio RPMI 1640 (Himedia) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e gentamicina (40 mg/mL), para criopreservação.

### **Formulações tópicas**

Foram avaliadas seis formulações tópicas distintas, com propriedades hidratantes ou anidras e contendo a presença de óleos vegetais (informações confidenciais – Projeto Vaikutus). Seis formulações tópicas diferentes foram preparados utilizando Polawax® como emulgente e 30 % de óleos vegetais de Andiroba (A) e Copaíba (C) para cremes hidratantes e 50% de óleos de cremes anidros. Metilparabeno e propilparabeno foram utilizados como conservantes. Todas as formulações são emulsões de cremes não-iônicos produzidos pelo

método de inversão de fases. A pentamidina (Lomidine®) utilizado foi produzido pela AK Scientific. Cremes hidratantes foram ACE0B (contendo óleos, emulgente e conservantes) ACE5A (10 % pentamidina) e ACE5AU (10 % de pentamidina) e 10 % de ácido úsnico e emulsões anidras foram ACP (10 % de isetionato de pentamidina) ACPU (10 % isetionato de pentamidina e de 10 % de ácido úsnico), e ACU (10 % de ácido úsnico) .

### **Origem e infecção dos animais**

Os animais utilizados foram 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e adultos provenientes e mantidos no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, mantidos em gaiolas em salas condicionadas com fotoperíodo, em condições de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê e Ética em Pesquisa Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA-INPA), com a aprovação do projeto sob o número de protocolo 009/2012.

Os animais foram separados nos grupos experimentais, sendo infectados no focinho com as 0,1 mL de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ( $1,0 \times 10^6$  parasitas/mL) provenientes de cultura em meio NNN. Os animais permaneceram sob supervisão até o aparecimento das lesões para o início dos estudos.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram separados em grupos de tratamento após o aparecimento das lesões causadas por *Leishmania (L.) amazonensis*, após três semanas de infecção dos animais. As lesões foram previamente aferidas para garantir homocedasticidade dos grupos de

tratamento quanto ao volume total da lesão. Os animais foram utilizados em dois experimentos distintos.

I - O primeiro experimento utilizou 36 hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* no focinho, separados nos seguintes grupos: Grupo Tratamento com ACE5A (Creme contendo pentamidina); grupo Tratamento ACE5AU; grupo ACE0B (creme sem pentamidina) e grupo Sem Tratamento (controle negativo). Os grupos receberam uma aplicação da emulsão no local da lesão, 50 mg/animal por dia, por oito dias consecutivos. Os animais permaneceram em observação e coleta de dados por mais 32 dias sem tratamento. A eutanásia ocorreu após os 40 dias de experimentação.

II – O segundo experimento utilizou 24 hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* no focinho, separados nos seguintes grupos: Grupo Tratamento com ACP (creme com pentamidina); Grupo Tratamento ACPU; Grupo Tratamento ECU e grupo sem Tratamento e Grupo Tratamento (Controle Negativo). Os grupos receberam uma aplicação da emulsão no local da lesão, 50 mg/animal por dia, por 10 dias consecutivos e os animais permaneceram sob observação por mais 20 dias consecutivos. A eutanásia ocorreu após 30 dias de experimentação

### **Avaliação dos efeitos do tratamento**

**Avaliação clínica:** todos os animais dos grupos experimentais foram submetidos a aferição diária dos valores do volume total da lesão (comprimento, largura e altura) utilizando paquímetro (Zaas Precision®) para análise da progressão da lesão. Os dados numéricos foram registrados, tabelados e analisados estatisticamente. As lesões foram fotodocumentadas para análise da evolução morfológica macroscópica.

**Eutanásia:** Os animais serão eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoina sódica), de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação e aprovado pela comissão de ética animal do INPA (CEUA).

**Estudos Parasitológicos:** Uma amostra de tecido seccionado da área da lesão de cada animal foi utilizado para impressão em lâminas de vidro. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A densidade de parasitas (amastigotas) e de macrófagos infectados foi estimada por análise em microscopia óptica sob óleo de imersão (1000 X) e ao menos 25 campos de cada lâmina foram contados e registrados. Foram considerados campos para contagem os que possuíam ao menos cinco macrófagos. Os dados foram tabelados, e foram obtidas a média de amastigotas e a média de macrófagos infectados para cada animal da experimentação. A relação percentual de parasitas foi obtida pelo índice  $\% \text{ parasitas} = \bar{X} \text{ animal} \frac{100}{X \text{ máx}}$ .

**Viabilidade de parasitas em meio de cultura:** cultura foi preparada a partir de amostras de lesões obtidas de cada animal experimental. Uma amostra foi seccionada longitudinalmente da área da lesão após a tricotomia e assepsia dos animais. A amostra foi imersa em salina contendo gentamicina (40 mg/mL) e após, transferidas assepticamente para meio NNN e mantidas por oito dias a 25 ° C. As culturas foram determinadas como negativas quando não havia a presença de parasitas após o período de incubação.

**Microscopia Eletrônica de Transmissão:** Amostras de tecido seccionado da área da lesão de cada animal, com dimensões de 1,0 x 1,0 x 1,0 mm, foram fixado em glutaraldeído em tampão cacodilato (2,5% v/v) e submetidos a análise por TEM (Microscopia Eletrônica

de Transmissão). Blocos foram preparados com kit de submersão epóxi (Sigma-aldrich®) e os experimentos foram realizados em FEI TECNAI G12 Spirit-Twin (120 kV, LaB6) e microscópio equipado com câmera FEI Eagle 4k CCD (Eindhoven, The Netherlands). O seccionamento das amostras (espessura de 100 nm) foram obtidos em ultramicrometro Leica UC7 (Wien, Austria) e repassados a grades de cobre de 400 mesh.

**Análise estatística:** Os dados registrados da aferição foram tabelados e analisados pelo programa GraphPrism 6.0, por two-way ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança para serem considerados significativos.

## **RESULTADOS**

A figura 20 apresenta os resultados da evolução em volume das lesões em relação aos dias de aplicação e observação após o término da aplicação. Entre os cremes hidratantes, o tratamento que apresentou a melhor evolução no aspecto clínico e na eficiência da redução do volume total das lesões, quando comparado com as médias do grupo controle, foi o creme ACE5AU (figura 20). O creme ACE0B provocou um intumescimento da lesão, associado à vermelhidão da lesão. O teste estatístico mostra diferença significativa entre o grupo ACE5AU e o grupo controle após o 29º dia, mas o grupo ACE5AU mostrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) após o 26º dia. O grupo ACE5AU mostrou diferença do grupo ACE5A no 40º dia de experimentação. As médias das lesões permaneceram estáveis no grupo ACE5AU durante o tratamento e com pequeno aumento após o tratamento, diferente dos demais grupos que apresentaram um aumento da área da lesão. Do ponto de vista clínico morfológico, observou-se que o tratamento com ACE0B, que contém apenas a formulação sem princípios ativos, induziu um intumescimento da área da lesão (figura 22), promovendo

um edema no focinho dos hamsters tratados, de aspecto lustroso, que iniciava sempre após a aplicação do creme. Este fato foi também verificado no grupo ACE5A, porém em menor intensidade. O grupo tratado com ACE5AU já apresentou menor intumescimento e alguns animais iniciaram um processo e formação de cicatriz na área lesionada (figura 22).

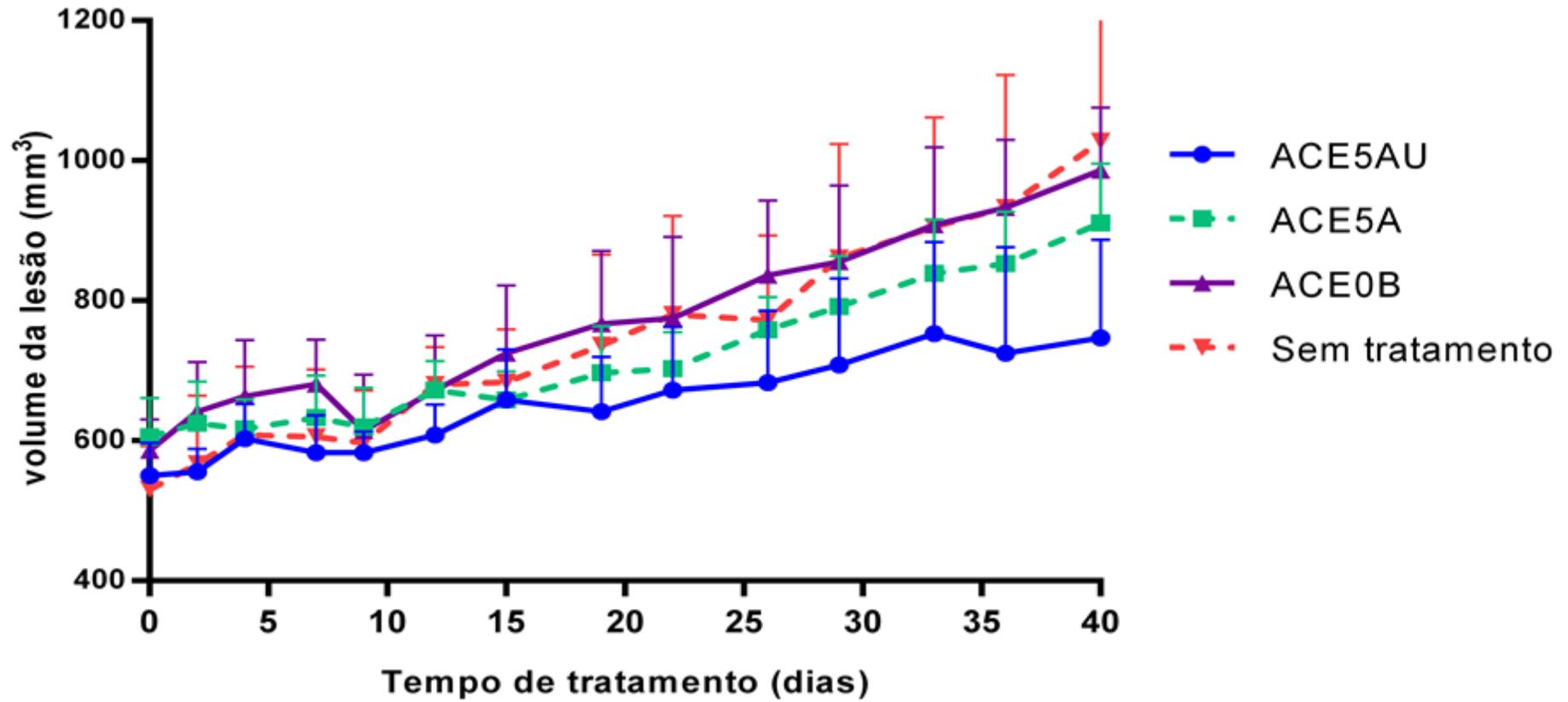


Figura 20 – Evolução clínica do volume das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante e após o tratamento tópico com cremes hidratantes. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico.

No grupo controle, as lesões permaneciam aumentando sem a formação de crostas ou cicatrização, nem de edema de aspecto lustroso.

As análises das impressões em lâmina em microscopia óptica destes animais submetidos ao tratamento com os cremes hidratantes mostrou ainda a presença de amastigotas *L. (L.) amazonensis* em todos os animais tratados apesar de valores quantitativos variáveis (figura 21). Diferenças estatísticas foram observadas entre os tratamentos ACE5A e ACE5AU quando comparados os valores percentuais de amastigotas no grupo controle ( $p < 0,001$ ) e também quando comparados estes dois grupos com o grupo placebo ACE0B. Quanto à média percentual de macrófagos infectados, não foram constatadas diferenças estatísticas para nenhum grupo de tratamento.

A verificação da viabilidade parasitária após o cultivo em NNN dos fragmentos de lesões dos grupos experimentais mostrou a presença de parasitas ativos, forma promastigotas em todos os tratamentos. A microscopia eletrônica possibilitou também verificar os amastigotas intracelulares nos tratamentos (figura 23).

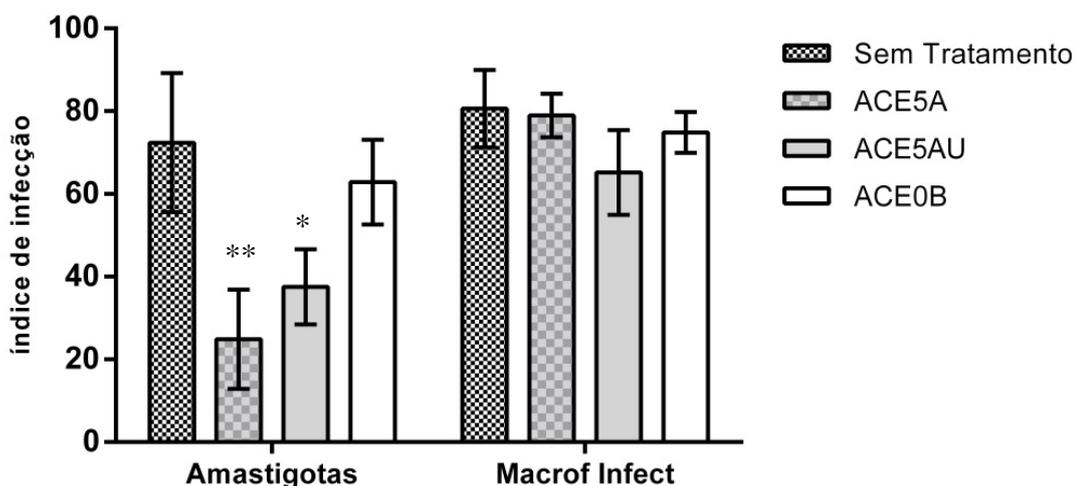


Figura 21 – Valores médios do número de amastigotas contados por campo, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com cremes hidratantes e grupo controle, coradas por Giemsa e contadas em 1000X.

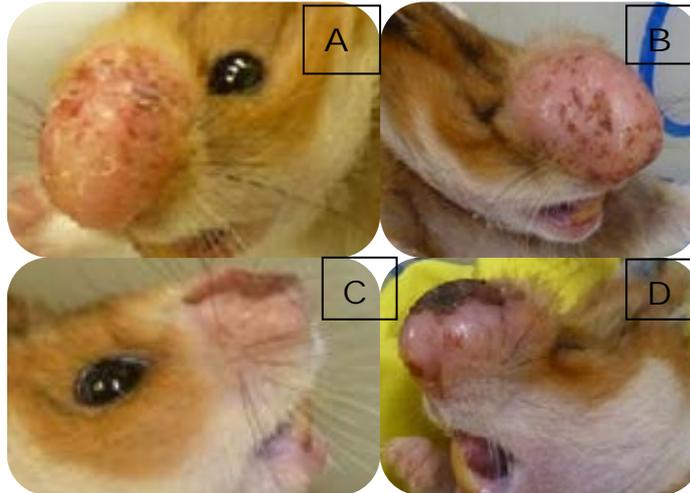


Figura 22 – Aspecto clínico macroscópico das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no oitavo dia pos- tratamento com cremes de aplicação tópica hidratantes. A – controle; B – ACE0B; C- ACE5AU; D – ACE5A

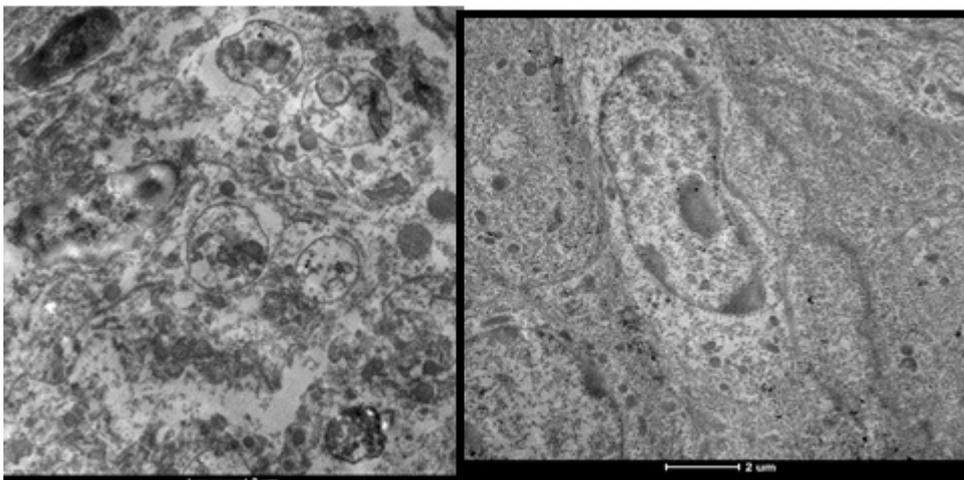


Figura 23 - Micrografia (MET) de tecido de animais experimentalmente infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* que receberam tratamento apenas com a base de fórmula ou nenhum tipo de tratamento (grupo placebo ACE0B e grupo controle). Presença de formas amastigotas.

A evolução das lesões dos grupos que receberam o tratamento com os cremes anidros (figura 24) mostraram que não houve em nenhum grupo uma diferença estatística significativa na média do volume das lesões durante os 10 dias de tratamento. Porém, o acompanhamento após os dias de tratamento, mostrou que no vigésimo dia de experimentação as lesões do grupo controle tiveram um aumento significativo, enquanto que os demais grupos permaneceram com o tamanho das lesões constantes. As análises estatísticas mostraram que os três grupos de tratamento, ACP, ACPU e ECU apresentaram diferença significativa do grupo controle ( $p < 0,05$ ) a partir do vigésimo dia, até o fim da observação. O aspecto clínico das lesões dos grupos tratados não mostrou nenhuma propriedade específica para algum grupo (figura 26), possuindo animais que apresentaram a produção de casca no ferimento em praticamente todos os grupos.

A análise por microscopia ótica também apresenta a presença de amastigotas em todos os grupos (figura 25). Quando as culturas dos fragmentos foram analisadas, todas mostraram-se positivas para a presença de promastigotas viáveis de *L. amazonensis*. Porém a morfologia das células dos parasitas presentes nas lesões dos animais que receberam o tratamento ACP apresentaram uma alteração quando visualizadas por microscopia TEM (figura 27), mostrando uma redução celular associada a uma aparente deformação na membrana plasmática. Quando analisados os valores médios do percentual de amastigotas presentes nas amostras dos grupos, verificou-se diferença estatística do grupo controle, os grupos de tratamento com ACP ( $p = 0,0322$ ), ACPU ( $p = 0,0002$ ) e ECU ( $p = 0,0248$ ). Porém, os valores percentuais de macrófagos infectados presentes nas impressões em lâminas mostraram diferença significativa apenas entre o grupo ACPU e sem tratamento (controle negativo).

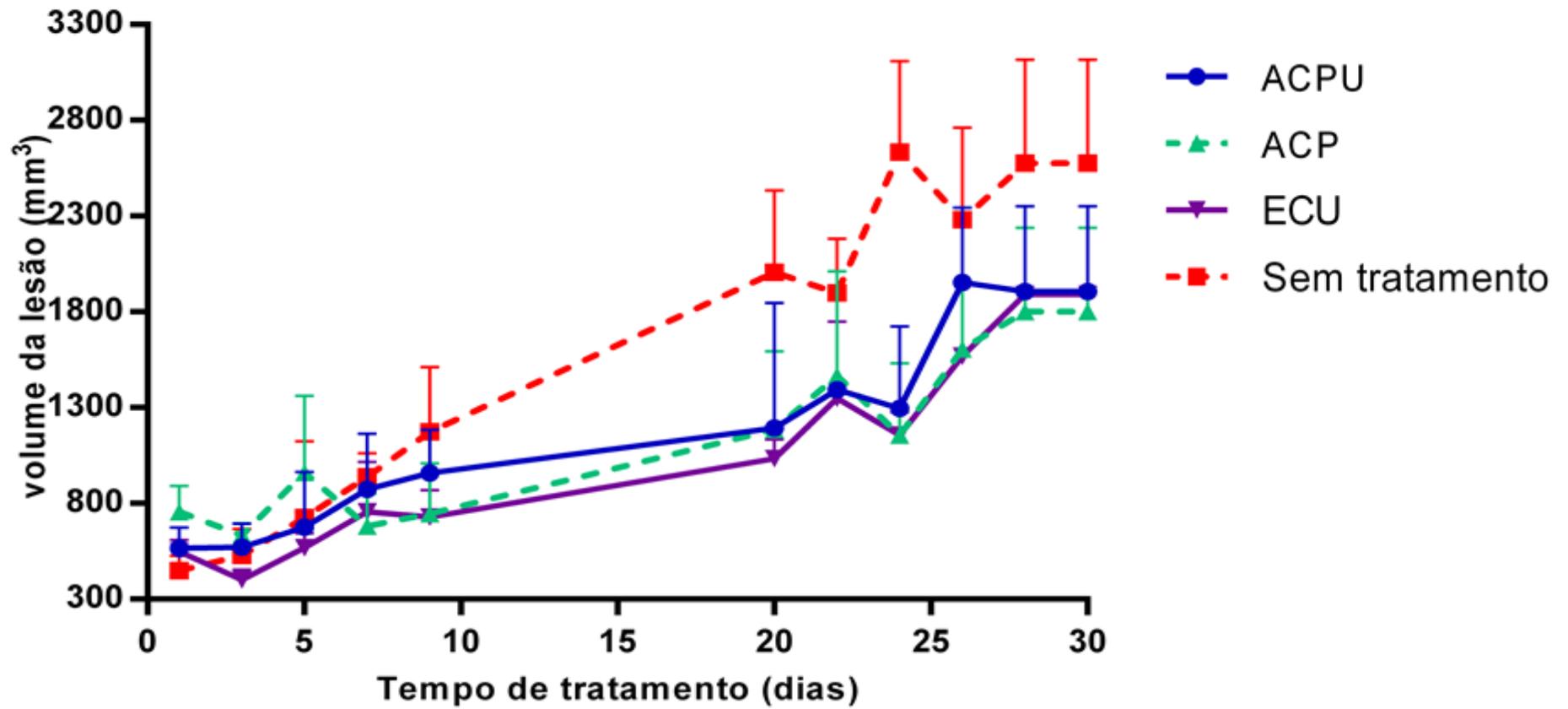


Figura 24 Evolução clínica do volume das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante e após o tratamento tópico com cremes anidros. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico.

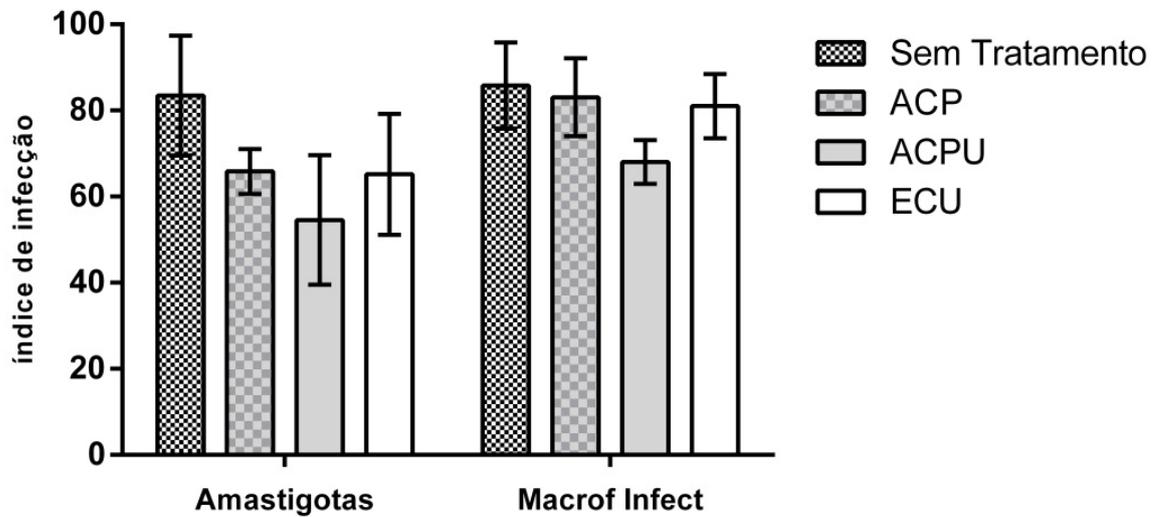


Figura 25 - Valores médios do número percentual de amastigotas e macrófagos infectados, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com cremes anidros e grupo controle, coradas por Giemsa e contadas em 1000X.

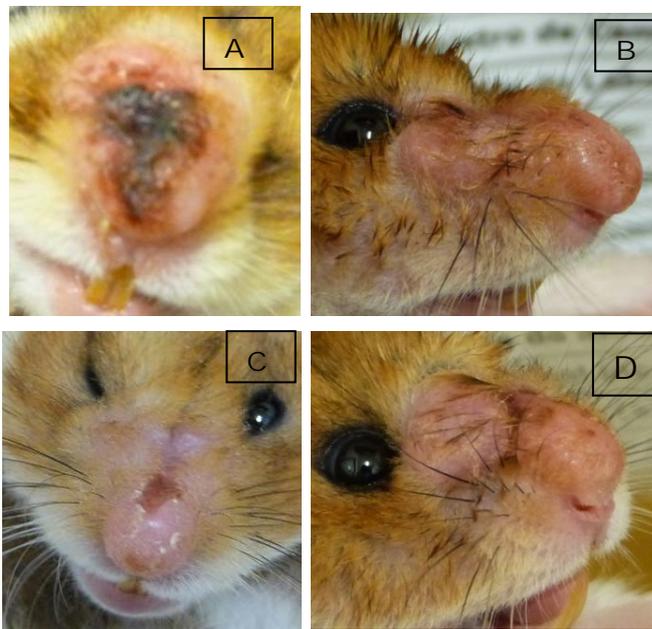


Figura 26 - Aspecto clínico macroscópico das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no décimo dia pos- tratamento com cremes de aplicação tópica anidros. A – controle; B – ECU C- ACPU; D – ACP

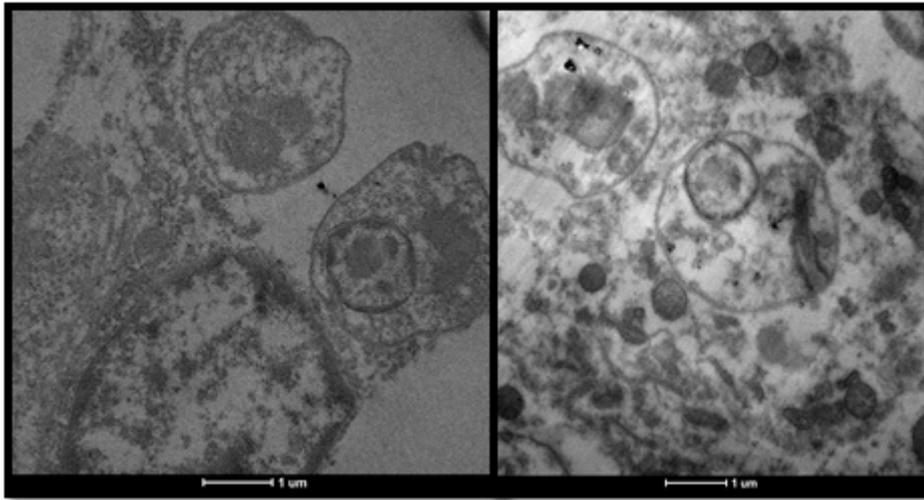


Figura 27 - Microfotografia (MET) de tecido de lesão de hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectado com *Leishmania (Leishmania).amazonensis*, após 30 dias de tratamento A – grupo controle, sem tratamento. B – grupo que recebeu tratamento com formulação contendo 10% de pentamidina (ACP).

## DISCUSSÃO

Tratamentos tópicos contendo paromomicina (El-On *et al.*, 1993) e Tamoxifen (Eissa *et al.* 2011), que também utilizaram a metodologia de aferição do volume da leão, clínico, e impressão em lâmina para o acompanhamento do efeito dos tratamentos, mostraram a possibilidade de utilizar fármacos conhecidos para desenvolver novas formas de tratamento, apresentando resultados também promissores.

Larbi *et al.* (1995) verificaram a eficiência do tratamento tópico na LC na Arábia Saudita utilizando preparados contendo 1% de clotrimazol e 2 % de miconazol em um estudo clínico randomizado e duplo-cego. Neste estudo, foi observado que o clotrimazol foi mais eficiente na redução das lesões, porém ainda muito limitado para o uso no tratamento da leishmaniose, apresentando ainda parasitas no fim do tratamento.

Outro estudo com formulação tópica foi utilizando a imidazoquinolina, uma droga aprovada para tratamento de verrugas genitais que em sistemas *in vitro*, apresentou atividade antileishmania por estimular a produção de óxido nítrico pelo macrófago infectado, diminuindo o número de parasitas.

No estudo de Miranda-Verastegui *et al.* realizado nas regiões endêmicas dos Andes peruanos e da selva peruana, foram incluídos 40 pacientes infectados pela *L. (V.) peruviana* ou *L. (V.) braziliensis*. O estudo avaliou a eficácia da combinação de imiquimod 5% tópico e antimonial pentavalente comparada ao uso de antimonial isolado durante 20 dias no tratamento da LC. A proporção de pacientes que alcançou a cura clínica nos primeiros meses (um, dois e três) após o fim do tratamento foi maior no grupo tratado com imiquimod e antimonial. Porém, foram relatados efeitos colaterais no grupo tratado com imiquimod, tais como, eritema, edema, prurido, queimadura e dor (Almeida e Santos, 2010).

A paromomicina é um fármaco que tem recebido especial atenção quanto ao seu uso na forma tópica, ao contrário de trabalhos de utilizam a pentamidina nesta via de administração (El-On et al. 1993; Gonçalves et al., 2005; Bavarsad et al., 2012). Além de emulsões hidrofóbicas que mostraram resultados promissores com 15% de paromomicina (El-On et al 1988), e sua combinação com imunomoduladores como Imiquimod (El-On, Bazarsky, Sneir, 2007) formas coloidais encapsuladas em lipossomos também mostraram eficácia na redução da lesão e carga parasitária (Bavarsad *et al*, 2012), mas com tratamento de 4 semanas de aplicação tópica.

Em um estudo com os cremes contendo Paromomicina em pacientes com LC no Equador mostraram que o tratamento possui eficácia terapêutica após utilização prolongada (Armijos *et al* 2004), o que pode explicar o resultado não satisfatório para o controle parasitológicos após o cronograma de tratamento de 10 dias com cremes com pentamidina.

Assim, esforços multidisciplinares continuam sendo importante para o desenvolvimento de um tratamento tópico eficaz no tratamento da LC, utilizando novos princípios ativos que podem atuar concomitantemente com fármacos já conhecidos com ação anti-leishmania. Foram comparados os diferentes emulsões (anidras ou hidratantes) quanto a sua ação sobre lesões com *L. amazonensis*, possibilitando selecionar a formulação que apresentou resultados mais promissores para futuros estudos contendo pentamidina, uma vez que não há relatos do estudo deste fármaco em preparações de uso tópico.

Os tratamentos ACE5AU apresentaram maior eficiência no controle da lesão desenvolvida, mas ainda não foi capaz de inibir os parasitas após o tratamento. Porém, quando analisados os resultados da morfologia do parasita após os tratamentos, verificou-se a possibilidade do evento de penetração dos do fármaco através dos tecidos epiteliais, e assim possivelmente evitando que a resposta inflamatória e a multiplicação parasitária ocorram de formas mais controladas nos animais submetidos aos cremes anidros, em especial contendo pentamidina. As formulações tópicas contendo pentamidina podem ser uma fonte de novos estudos para o tratamento da leishmaniose cutânea.

## **CONCLUSÕES**

O tratamento que apresentou a melhor evolução no aspecto clínico e na eficiência da redução do volume total das lesões, quando comparado com as médias do grupo controle, foi o creme ACE5AU.

## CAPÍTULO IV

### EFEITO DE FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO EXTRATO DE *LIBIDIBIA FERREA* NA LEISHMANIOSE CUTANEA EXPERIMENTAL

Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski<sup>1</sup>, Iryna Grafova<sup>2</sup>, Maurizio Avella<sup>3</sup>, Pierre Alexandre dos Santos<sup>4</sup>, Bruno Bezerra Jansen<sup>1</sup>, Maricleide Farias Naiff<sup>1</sup>, Gennaro Gentile<sup>3</sup>,  
Andriy Grafov<sup>2</sup>, Antonia Maria Ramos Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Manaus - AM. Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Química Inorgânica, Instituto de Química. Universidade de Helsinki, A.I.Virtasen aukio 1, 00014, Helsinki, Finlândia.

<sup>3</sup>Instituto de Química e Tecnologia de Polímeros (ICTP) - CNR, Via Campi Flegrei, 34, 80078, Pozzuoli, Napole. Itália.

<sup>4</sup>Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás. Rua 240, esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário. CEP: 74605-170. Goiânia - GO, Brasil

## RESUMO

Os tratamentos convencionais utilizados para a Leishmaniose – antimoniais pentavalente, pentamidina e anfotericina – apresentam efeitos colaterais e dificuldades devido a sua administração parenteral. Por outro lado, o uso de produtos naturais de origem vegetal pode ser uma alternativa, uma vez que muitas substâncias já foram relatadas na literatura como ativas contra parasitas do gênero *Leishmania*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de emulsões tópicas contendo o extrato de *Libidibia ferrea* em animais infectados experimentalmente com *Leishmania*. Este estudo utilizou hamsters (*Mesocricetus auratus*) os quais foram infectados no focinho ou nas patas com *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. Os animais foram agrupados para receber tratamento tópico (excepto o grupo controle negativo) na área das lesões ou Glucantime® intramuscular (controle positivo). Após o tratamento, amostras foram avaliadas por histologia, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e cultivo dos fragmentos de biópsia de lesões em todos os grupos experimentais. Os resultados mostraram que não houve eficácia na redução da lesão ou controle parasitológico. O tratamento com emulsão tópica em focinho mostrou diferenças estatísticas da lesão entre o controle positivo e negativo após 14 dias ( $p = 0,0087$ ) e diferença entre o grupo controle negativo e a emulsão Placebo e a emulsão com 2,5% EpMeOH após 20 dias de tratamento. Porém, a redução de macrófagos infectados apenas foi observada apenas no controle positivo. Estes resultados indicaram que os efeitos devem ser considerados para diferenças nas áreas de pele, como a espessura da queratinização, e o tratamento tópico com esta concentração de extracto utilizado na formulação não era eficaz para reduzir e cura clínica.

**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea, tratamento tópico, emulsões, extratos vegetais *Libidibia ferrea*

## ABSTRACT

Treatment of cutaneous leishmaniasis (LC) is difficult due to scarce number of drugs capable to eliminate completely the intracellular form of parasite, and presents a number of problems which include parasite resistance, induction of side effects, and are requires parenteral administration. The aim of the present study was to evaluate the efficacious of topical formulations containing extract of *Libidibia ferrea* in the treatment of cutaneous leishmaniasis in different areas of animal infected. A topical cream consists in emulsions and was prepared by inversion phases with vegetable oils and 2.5% of metanolic extract from epicarp of *L. ferrea*. Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were used as experimental model infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, and inoculation were done in foot and snout. Animals were grouped to receive topical treatment (except the control group) in the area of the lesions, or Glucantime® intramuscular (positive controls). After the treatment were evaluated by histology, transmission electron microscopy (TEM) and biopsy cultivation of the lesions fragments in all experimental groups. The results showed that treatment with emulsion in foot was no efficacy when compared total lesion size after treatment, and parasitological analyses. Treatment with topical emulsion in snout shows statistical differences of lesion area between positive and negative controls after 14 days ( $p = 0,0087$ ), and placebo and emulsion with 2.5% EpMeOH showed statistical difference after 20 days of treatment. Thus, reduction of infected macrophages just was observed in positive control. This result indicated that the therapeutics effects must be considered for differences in skin areas, like thinness keratinization. Here is discussed the extract concentration, treatment duration and the possibility of associations with others drugs to reduce or to obtain clinical cure for this disease

**Key words:** Cutaneous Leishmaniasis, topical treatment, emulsion, metanolic extract, *Libidibia ferrea*

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses, protozoonoses heteroxênicas, apresentam alta prevalência em regiões de climas tropical e subtropical do Velho e Novo Mundo (Paiva *et al.*, 2007). Apesar de haver registro de casos de LTA em todas as regiões do país, as regiões Norte e Nordeste são as que apresentam maior percentual de casos nos últimos anos. A média de casos notificados entre 1991 e 2010 foi de 27.374 ao ano, concentrando o maior número na região Norte (36,4%) (Brasil, 2013). Relatos de surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização.

As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento com os fármacos mais utilizados para as leishmanioses, como os antimoniais pentavalente (Soares-Bezerra *et al.*, 2004), paralelamente aos seus efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores a buscar novas substâncias com ação contra *Leishmania*, assim como também formas farmacêuticas que possuam maior facilidade de administração e menores efeitos colaterais. As plantas, por sua vez, possuem a capacidade de produção de uma diversidade de metabólitos secundários (produtos naturais) com atividades biológicas de grande interesse na sociedade humana.

Até o final do século XX, estudos estimaram que cerca de 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, utilizou os produtos naturais como fonte primária nos tratamentos de doenças (Nunez-Sellés *et al.*, 2007). Ao contrário dos medicamentos convencionais, os fitoterápicos são misturas de constituintes, ao menos em parte delas, sem caracterização química, e por serem constituídos por uma mistura fornecem vantagem terapêutica, pois os componentes desconhecidos podem combinar entre si e com aqueles já determinados de maneira sinérgica resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido puro (OMS, 2008).

Estudos químicos e farmacológicos de extratos obtidos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz tem demonstrado seu potencial biológico anti-inflamatório (Carvalho *et al.* 1996), bactericida, agente hipoglicemiante e antioxidante (Batubara *et al.*, 2009), e também mostrou inibição do crescimento *in vitro* de *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* (Cortez, 2004, Falcão, 2010, Wyrepkowski *et al.*, 2015).

Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes para o tratamento da Leishmaniose, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos da *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas. Além disso, novas formas de aplicação devem ser consideradas para o desenvolvimento de métodos de veiculação de fármacos.

O desenvolvimento de formulações tópicas seria um método alternativo para o tratamento da leishmaniose cutânea. Embora o transporte transdérmico de fármacos tenha muitas vantagens sobre outras vias de administração, este ainda apresenta problemas a serem investigados, como a baixa penetração da maioria dos compostos através da pele humana (Rossi-Bergmann, 2009). As vantagens da utilização do tratamento tópico incluem evitar o metabolismo hepático de primeira passagem, impedir a exposição às condições químicas e biológicas do trato gastrointestinal, menores níveis de fármacos no plasma e o conforto do paciente na aplicação (Zanchetta, 2009).

Pretende-se com este estudo contribuir para a obtenção de formulações com base fitoterápica, utilizando extratos de *L. ferrea* no combate a esta importante doença negligenciada, endêmica do Brasil.

## **METODOLOGIA**

### **Formulações tópicas**

Foram preparadas duas emulsões óleo-água contendo 30% de Óleo Vegetal (Copaíba e Andiroba) e 57,3% de água deionizada, utilizando como agente emulsificante Polowax® (6%) e estabilizante Xantana (0,5%). Todas as emulsões são formulações não-iônicas produzidos pelo método de inversão de fases. Utilizou-se como conservantes propilparabeno e metilparabeno (Nipagin [1%] e Nipazol [0,3%]). Nas emulsões, foram adicionados 2,5% de extrato Metanólico do Epicarpo de *Libidibia ferrea*. Foram avaliadas as emulsões contendo o extrato (Emuls+Extrato) e somente os excipientes, considerados Placebo do experimento (Emuls Placebo).

### **Origem e Manutenção dos parasitas**

Utilizou-se a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2006/IM5584), mantida e criopreservada no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Saúde Ambiente e Sociedade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os parasitas são cultivados em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e a cultura expandida em meio RPMI 1640 (Himedia®) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e gentamicina (40 µg/mL), para criopreservação.

### **Origem e infecção dos animais**

Os animais utilizados foram 42 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e adultos provenientes e mantidos no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, mantidos em gaiolas em salas condicionadas com fotoperíodo, em condições de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê e Ética em Pesquisa Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA-INPA), com a aprovação do projeto sob o número de protocolo 009/2012.

Os animais foram separados nos grupos experimentais, sendo infectados na pata direita traseira ou no focinho com as 0,1 mL de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ( $1,0 \times 10^6$  parasitas/mL) provenientes de cultura em meio NNN. Os animais permaneceram sob supervisão até o aparecimento das lesões para o início dos estudos.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram utilizados em dois experimentos distintos:

I - O primeiro experimento utilizou 18 hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* na pata direita traseira, separados nos seguintes grupos: Grupo Tratamento com Emulsão contendo o extrato EpMeOH (2,5%); grupo Tratamento Emulsão Placebo; grupo Sem Tratamento (controle negativo). Os grupos receberam uma aplicação da emulsão no local da lesão com curativo oclusivo, 50mg/animal por dia, por 10 dias consecutivos. Após 10 dias de tratamento, os animais receberam uma aplicação de 50 mg/animal em dias alternados (a cada dois dias) por mais 20 dias. A eutanásia ocorreu após os 30 dias de tratamento.

II – O segundo experimento utilizou 24 hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* no focinho, separados nos seguintes grupos: Grupo Tratamento com Emulsão contendo o extrato EpMeOH (2,5%); Grupo Tratamento Emulsão Placebo; grupo sem Tratamento e Grupo Tratamento (Controle Negativo) e Grupo Tratamento com Glucantime® (20 mg

Sb<sup>5</sup>/Kg/dia IM) (Controle Positivo). Os grupos receberam uma aplicação da emulsão no local da lesão, 50 mg/animal por dia, por 25 dias consecutivos. A eutanásia ocorreu após 25 dias de tratamento.

**Avaliação clínica:** todos os animais dos grupos experimentais foram submetidos a aferição diária dos valores do volume total da lesão (comprimento, largura e altura) utilizando paquímetro (Zaas Precision®) para análise da progressão da lesão. Os dados numéricos foram registrados, tabelados e analisados estatisticamente. As lesões foram fotodocumentadas para análise da evolução morfológica macroscópica.

**Eutanásia:** Os animais serão eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoína sódica), de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação e aprovado pela comissão de ética animal do INPA (CEUA).

**Estudos Parasitológicos:** Uma amostra de tecido seccionado da área da lesão de cada animal foi utilizado para impressão em lâminas de vidro. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A concentração de parasitas (amastigotas) e de macrófagos infectados foi estimada por análise em microscopia óptica sob óleo de imersão (1000 X) e ao menos 25 campos de cada lâmina foram contados e registrados. Foram considerados campos para contagem os que possuíam ao menos cinco macrófagos. Os dados foram tabelados, e foram obtidas a média de amastigotas e a média de macrófagos infectados para cada animal da experimentação. A relação percentual de parasitas foi obtida pelo índice %parasitas =

$$\bar{X} \text{ animal } \frac{100}{X_{\text{máx}}}$$

**Viabilidade de parasitas em meio de cultura:** cultura foi preparada a partir de amostras de lesões obtidas de cada animal experimental. Uma amostra foi seccionada longitudinalmente da área da lesão após a tricotomia e assepsia dos animais. A amostra foi imersa em salina contendo gentamicina (40 mg/mL) e após, transferidas assepticamente para meio NNN e mantidas por oito dias a 25 ° C. As culturas foram determinadas como negativas quando não havia a presença de parasitas após o período de incubação.

**Microscopia Eletrônica de Transmissão:** Amostras de tecido seccionado da área da lesão de cada animal, com dimensões de 1,0 x 1,0 x 1,0 mm, foram fixado em glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato (2,5% v/v) e submetidos a análise por TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão). Blocos foram preparados com kit de submersão epóxi (Sigma-aldrich®) e os experimentos foram realizados em FEI TECNAI G12 Spirit-Twin (120 kV, LaB6) e microscópio equipado com câmera FEI Eagle 4k CCD (Eindhoven, The Netherlands). O seccionamento das amostras (espessura de 100 nm) foram obtidos em ultramicrometro Leica UC7 (Wien, Austria) e repassados a grades de cobre de 400 mesh.

**Análise histopatológica:** amostras dos tecidos lesionados foram seccionadas e os fragmentos foram transferidos para formol tamponado a 10%, e posteriormente, submetidos ao processamento histológico para microscopia de luz. As lâminas histológicas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina. A confecção e leitura das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Morfologia da UFAM.

**Análise estatística:** Os dados registrados da aferição foram tabelados e analisados pelo programa GraphPad 6.0 (Prism®), por two-way ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança para serem considerados significativos.

## RESULTADOS

O experimento em patas utilizou curativo oclusivo para evitar que os animais tivessem contato via oral com as emulsões, uma vez que o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos somente pela via tópica, além de impedir processos oxidativos. As aferições do volume total das lesões ao antes do tratamento (21 dias após a inoculação do patógeno) mostrou que havia uma grande discrepância entre os volumes das lesões dos animais, demonstrado estatisticamente pelos valores de desvio padrão elevados. Os animais foram separados em grupos visando obter homocedasticidade nos valores do volume da lesão no início do tratamento, buscando a menor influência dos fatores imunológicos e fisiológicos diferenciais da resposta de cada animal.

A avaliação diária dos volumes das lesões durante o período de tratamento mostrou que os as médias dos volumes das lesões nas patas dos grupos que receberam o tratamento com as emulsões com Extrato EpMeOH (2,5%) de *L. ferrea* e a emulsão placebo foram numericamente menor que o grupo que não recebeu tratamento entre 6<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia de tratamento (figura 28), mas a análise estatística não apresentou diferença significativa entre os grupos de tratamento, até o fim do tratamento ( $p > 0,05$ ).

Em relação às análises parasitológicas, a contagem de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas presentes nos impressões em lâminas também não mostrou nenhuma diferença estatística entre nenhum grupo, apresentando todas as comparações  $p > 0,05$  (figura 29).

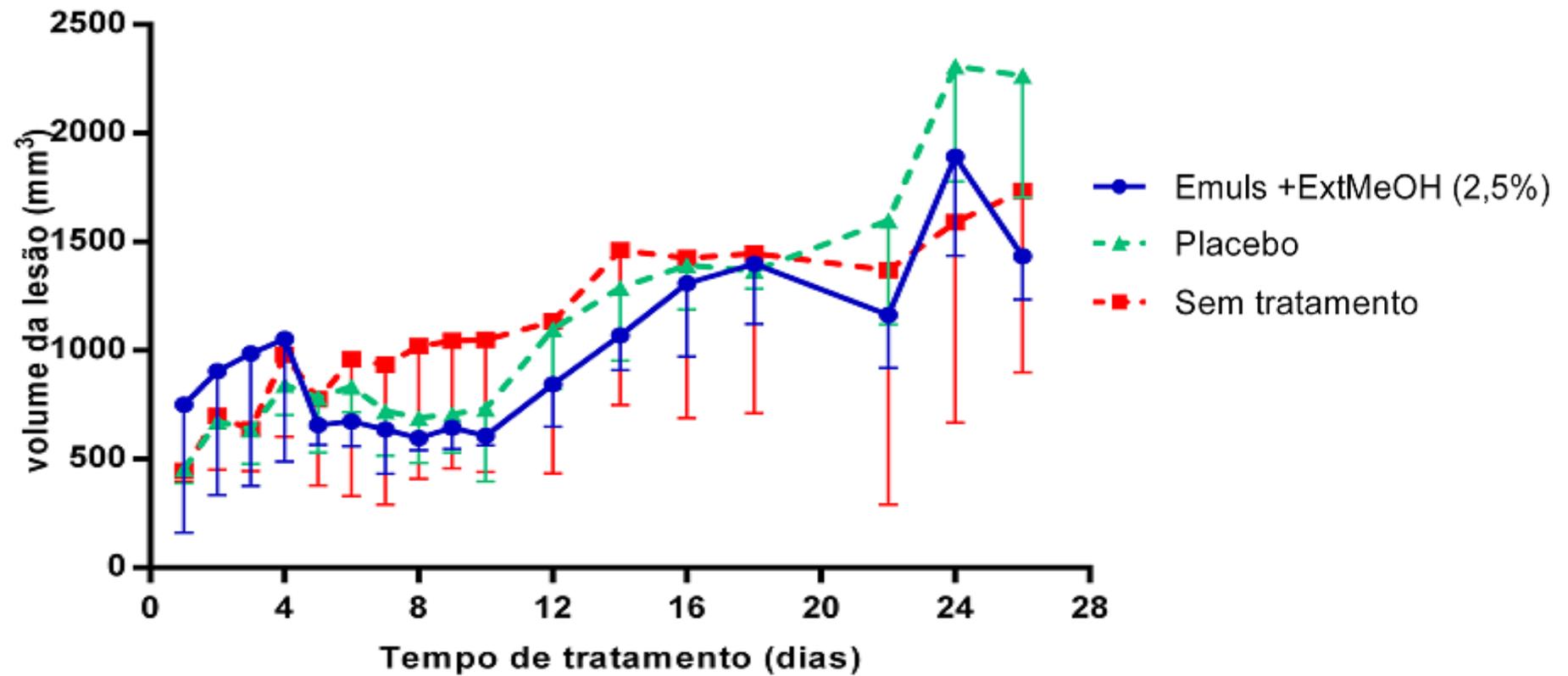


Figura 28 Evolução clínica do volume das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados na pata traseira direita com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante e após o tratamento tópico com emulsões tópicas. Controle: animais inoculados que não receberam tratamento

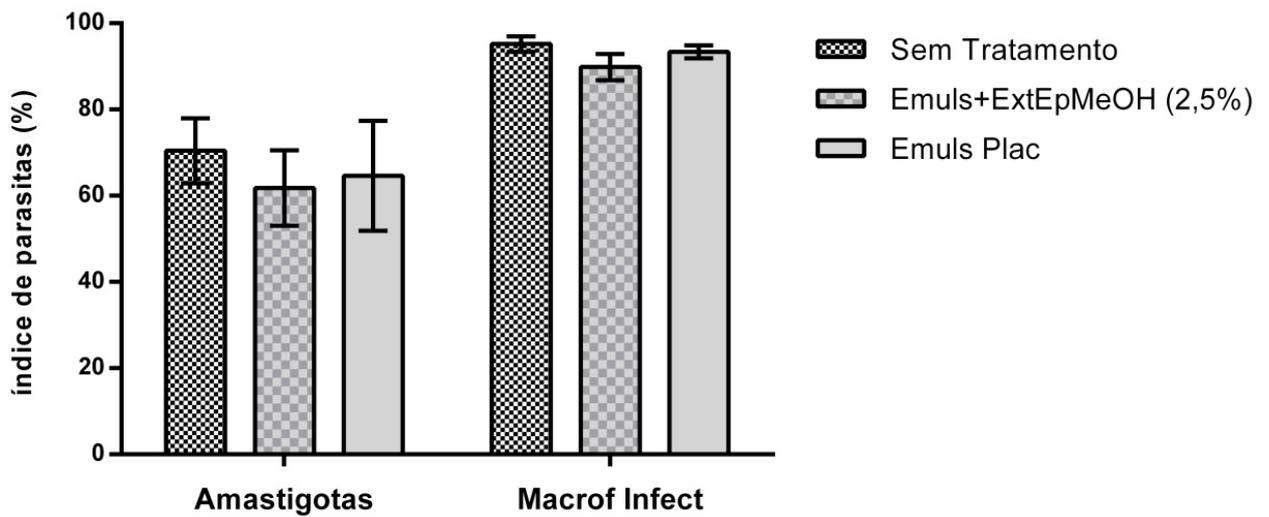


Figura 29 - Valores médios do número percentual de formas amastigotas e macrófagos infectados contados por campo, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com emulsões e grupo controle, coradas por Giemsa e quantificados em 1000X.



Figura 30 – Aspecto clínico macroscópico das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados na pata traseira direita por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no 10º dia após o tratamento com emulsões. A – Grupo tratado com emulsão com Extrato EpMeOH (2,5%). B – Grupo tratado com emulsão Placebo. C – Grupo infectado e não tratado.

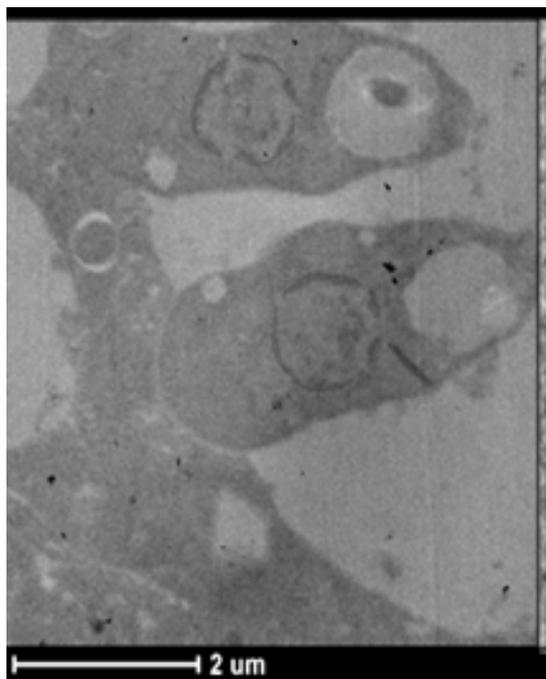


Figura 31 - Microfotografia (MET) de tecido de lesão em patas de hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectado com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, após 26 dias de tratamento com emulsão tópica contendo 2,5% de Extrato EpMeOH. Presença de formas amastigotas no vacúolo parasitóforo.

No grupo que recebeu tratamento tópico com creme contendo EpMeOH, porém, as lesões mostraram um aspecto lustroso (figura 30), de aparência similar aos cremes hidratantes avaliados, mas sem a presença de intumescimento da região a lesão. As lesões não apresentaram ulceração (figura 30).

Os resultados observados após o tratamento dos hamsters com emulsões tópicas na região do focinho, entretanto, diferem consideravelmente dos resultados obtidos em patas. O aparecimento das lesões na região do focinho, (3 semanas após a infecção) mostrou-se mais homogêneo entre os animais estudados, com maior homocedasticidade (figura 34).

Análises estatísticas mostraram diferença significativa entre os grupos de tratamento com Glucantime (IM) e o grupo que não recebeu nenhum tratamento após o 14º dia de tratamento com as emulsões tópicas ( $p = 0,0087$ ). Os grupos tratados com a emulsão contendo o extrato EpMeOH (2,5%) e com emulsão Placebo só apresentaram diferença estatística após o 20º dia de tratamento ( $p < 0,05$ ). Esta diferença no volume entre os grupos de tratamento no decorrer da experimentação está apresentado na figura 32.

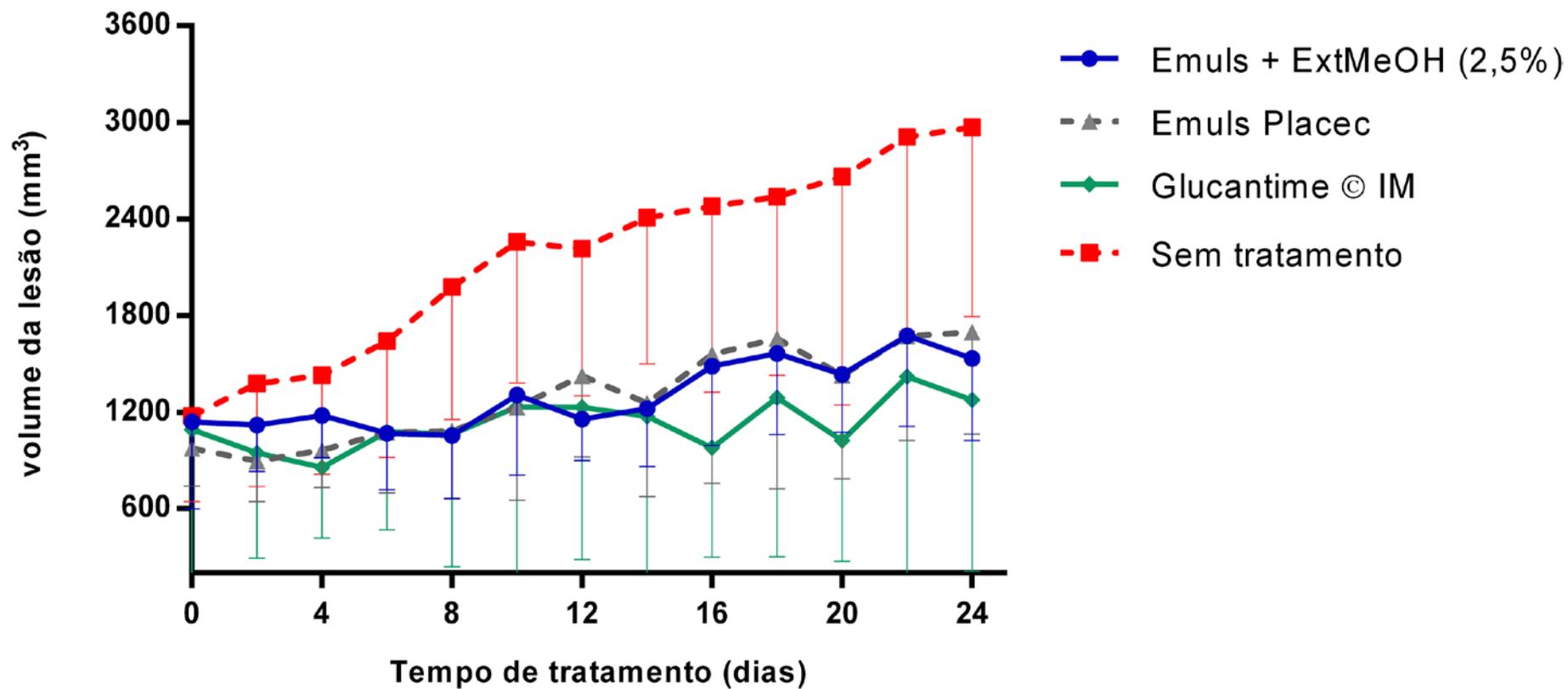


Figura 32 - Evolução clínica do volume das lesões em *Mesocricetus auratus* inoculados no focinho com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante e após o tratamento tópico com emulsões tópicas. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico.

Os valores obtidos da análise de impressões em lâminas mostrou que o valor percentual de amastigotas foi nitidamente menor no grupo com tratamento com Glucantime® do que a quantidade percentual verificada no grupo sem tratamento (figura 33). Análise por ANOVA mostrou forte diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) entre os dois grupos, para este parâmetro. Entretanto, diferença estatística também foi verificada entre o grupo de tratamento com o Placebo e o grupo sem tratamento ( $p = 0,0473$ ) e entre o grupo Placebo e o grupo tratado com Glucantime ( $p = 0,0453$ ). Já o grupo que recebeu tratamento com emulsão com extrato EpMeOH (2,5%) mostrou apenas diferença estatística do valor percentual de amastigotas com o grupo tratado com Glucantime ( $p = 0,0002$ ). Entretanto, comparando os valores médios de macrófagos infectados presentes nas impressões, apenas apresentou diferença estatística o grupo tratados com emulsão com extrato MeOHEp (2,5%) e o grupo tratado com Glucantime® ( $p = 0,0139$ ).

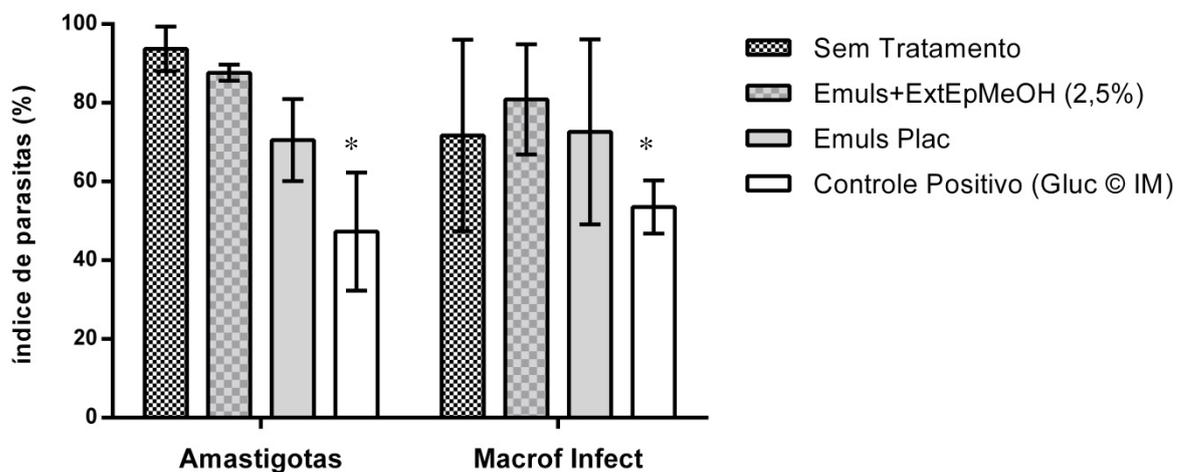


Figura 33 - Valores médios do número percentual de formas amastigotas e macrófagos infectados contados por campo, após impressão em lâmina de fragmentos das lesões dos grupos de tratamento com emulsões e grupos controle, coradas por Giemsa e contadas em 1000X.

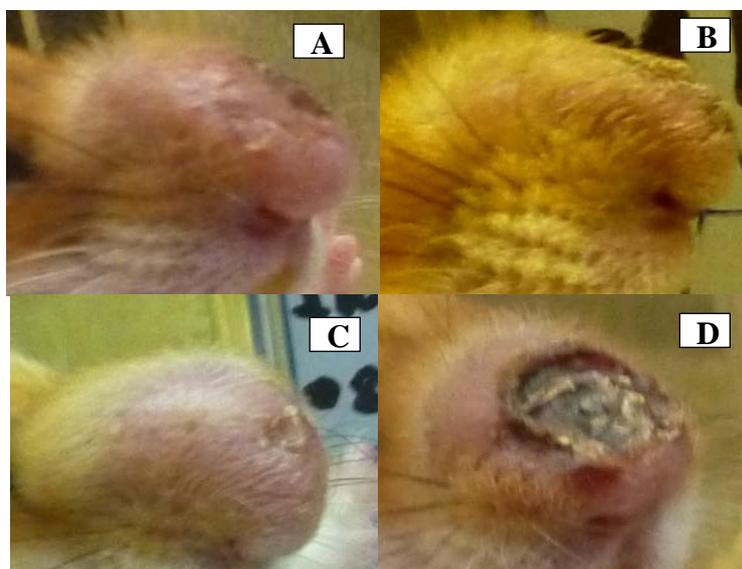


Figura 34 – Aspecto clínico macroscópico das lesões cutâneas em *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no 10º dia de tratamento com emulsões. A – Grupo tratado com emulsão com Extrato Metanólico do Epicarpo (EpMeOH) (2,5%). B – Grupo tratado com emulsão Placebo. C- Grupo tratado com

Após os vinte e cinco dias de tratamento pode-se avaliar o aspecto clínico das lesões dos hamsters de todos os grupos, através da forma macroscopicamente, em que se pode determinar uma comparação entre eles. Os animais do grupo tratado com emulsão com extrato EpMeOH (2,5%) apresentaram uma lesão inicial do tipo papular. Durante e após o tratamento alguns animais apresentaram uma crosta na área da lesão e não foi observada uma redução em seu volume. Os animais do grupo tratado com emulsão placebo também apresentaram lesões nodulares no início do tratamento. Durante e após o tratamento apresentaram na lesão ulceração. Os animais do grupo tratado com Glucantime® (IM) apresentaram no início do tratamento, lesões nodulares, durante e após o tratamento, mas

não verificou-se nestes animais neste tempo de tratamento, uma redução considerável como era esperado por ser uma droga considerada como de primeira escolha no tratamento padrão utilizado em humanos (Brasil, 2010). Os animais do grupo sem tratamento também apresentaram lesões nodulares no início do tratamento. Durante e após o tratamento as lesões se agravaram e apresentaram características ulcerosas com infecção secundária aparente (Figura 34).

Os fragmentos das lesões provenientes dos animais de todos os grupos foram semeados em meio NNN para verificação de parasitas e todos os grupos experimentais apresentaram formas de parasitas viáveis com formato fusiformes

## **DISCUSSÃO**

Estudos farmacológicos de novas terapias para o tratamento das Leishmanioses, em especial a Leishmaniose Tegumentar vêm sendo estudadas. Ensaio biológicos *in vivo* habitualmente utilizam como modelo animal camundongos BALB/c ou hamsters sírios, pois são mais suscetíveis a doença e apresentam maior disseminação dos parasitos (Lima 2008). A inoculação dos flagelados pode ser realizada em diferentes partes como, na base da cauda por via intradérmica (Rodrigues 2012), no coxim plantar (Eissa *et al.* 2011), orelha ou focinho.

Segundo Suman e Nishi (2011), através dos modelos animais é possível verificar a atividade de drogas a ser determinado em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção e para dar uma indicação inicial da toxicidade, embora nenhum reproduza com precisão o que acontece nos humanos. Poucos são os estudos com primatas como importantes modelos experimentais que melhor representam a forma clínica da doença

humana, apesar de serem pesquisas que possuem como objetivo principal experimentos com alvos vacinais (Grimaldi, 1995).

Este trabalho permitiu verificar as diferenças que ocorreram quando o tratamento foi aplicado sobre áreas distintas, com aspectos diferenciados quanto a epiderme lesionada. Dependendo do local de inoculação (focinho, para, orelha) os hamsters exibem uma evolução da doença previsível após a infecção experimental, sendo a maioria caracterizada por lesão ulcerativa crônica local e, como em seres humanos, podem variar dependendo do estado imunitário do indivíduo (Robledo *et al*, 2012). Porém, características da pele de cada um dos locais do corpo do animal, como a camada de queratina presente nas patas pode ter influenciado na resposta ao tratamento tópico.

Observou-se, por outro lado, que nos animais que receberam tratamento tópico na região do focinho, tanto do creme contendo o extrato EpMeOH (2,5%) quanto do creme base (placebo), ocorreu uma diferença significativa entre o volume total da lesão quando comparados ao grupo não tratado. Este resultado pode indicar que a ação dos excipientes utilizados na preparação da formulação influencia na evolução das lesões, porém não há interferência na viabilidade parasitária, uma vez que formas flageladas de *Leishmania* foram visualizadas em todos os grupos após cultura em NNN.

Segundo Schwartz *et al* (2014), a eficácia de um tratamento tópico contra leishmaniose cutânea depende de dois principais fatores: *i*) sobre a atividade leishmanicida intrínseca dos compostos e *ii*) a quantidade de droga capaz de atingir a derme, a camada mais profunda da pele, onde os macrófagos infectados encontram-se. Deste modo, a ausência de resultados mais promissores pode ser atribuída à concentração do extrato presente na emulsão, a forma de veiculação, que pode também não ser adequada para este material, o tempo de tratamento e o número de aplicações.

Além do princípio ativo é sabido que as características e o tipo das emulsões, o tamanho das gotículas, o emoliente, emulsificante são de grande importância para obtermos uma formulação com o efeito desejado. A adição de constituintes como o lauril sulfato de sódio, substância tensoativa capaz de remover os lipídios intercelulares e tornar a bicamada lipídica do estrato córneo mais fluida, é um exemplo de componente que pode facilitar a permeação do princípio ativo.

Porém, deve-se levar em consideração o potencial de irritação desta substância, bem como de outras substâncias que vem sendo usadas como promotores de absorção na pele, deste modo, outras formulações devem ser testadas no sentido de facilitar a penetração dos ativos, de uma melhor hidratação da pele, aumentando assim a permeação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas. O mecanismo exato ainda não é claro, mas sabe-se que o aumento do conteúdo aquoso do estrato córneo pode aumentar a solubilidade do permeante facilitando sua penetração. Outro efeito importante é a capacidade da água de intumescer o estrato córneo diminuindo a adesão entre os queratinócitos, facilitando a passagem de substâncias, como os fármacos de interesse.

Este fator justifica o uso de formulações oclusivas como as pomadas que, ao impedir a perda de água da pele, a deixa mais hidratada, facilitando a permeação de fármacos. Vários estudos indicam que a composição do veículo altera significativamente a permeação da substância ativa na pele. Os componentes da formulação interagem tanto com o fármaco quanto com as estruturas da pele são responsáveis pela maior ou menor liberação do ativo.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados mostram que as emulsões com o extrato EpMeOH (2,5%) não possibilitaram a cura clínica da forma cutânea da leishmaniose em animais de laboratório

suscetíveis a doença como os hamsters, assim como, não foi possível observar uma redução significativa das lesões cutâneas e das formas intracelulares, causadas por *L.(L.) amazonensis* nas condições e formulações utilizadas.

A redução da área total da lesão nos focinhos deve ser atribuída aos excipientes da emulsão, uma vez que o efeito do placebo foi o mesmo da emulsão com o extrato. Para futuros estudos, devem ser avaliadas maiores concentrações do extrato EpMeOH em formulações com outros excipientes e com tempo de tratamento mais prolongado.

## CAPÍTULO V

### EFEITO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO EXTRATO E FRAÇÃO DE *Libidibia ferrea* NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM HAMSTERS

Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski<sup>1</sup>, Bruno Bezerra Jensen<sup>1</sup>, Fabiane Veloso Soares<sup>1</sup>,  
Pierre Alexandre dos Santos<sup>2</sup>, Francimeire Gomes Pinheiro<sup>1</sup>, Aline Fagundes Silva<sup>3</sup> José  
Fernando Barcellos Marques<sup>4</sup>, Iryna Grafova<sup>4</sup>, Andriy Grafov<sup>5</sup>, Antonia Maria Ramos  
Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas. Centro de Pesquisas em Ambiente, Saúde e Sociedade. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás – UFG.

<sup>3</sup>Laboratório de Vigilância em Leishmaniose. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

<sup>4</sup>Laboratório de Histopatologia. Departamento de Morfologia. Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

<sup>5</sup>Laboratório de Química Inorgânica. Instituto de Química. Universidade de Helsinki.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença endêmica do Brasil, embora sua ocorrência seja relatada nos cinco continentes. Seu agente etiológico são protozoários do gênero *Leishmania*, sendo relatadas sete que podem causar a doença em humanos. Os tratamentos de primeira e segunda escolha são muitas vezes ineficazes, com muitos efeitos colaterais severos e requerem administração parenteral. Estes fatos motivam a busca de novos fármacos e/ou princípios ativos naturais e novas formas de administração também vem sendo estudadas. Este trabalho objetiva avaliar os efeitos de tratamentos tópicos utilizando hidrogéis e emulsão que contenham extrato ativo e fração ativa de *Libidia ferrea*, espécie nativa do Brasil. Para o estudo, foram utilizados grupos experimentais de hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com *L. (L.) amazonensis* na região do focinho e tratados com as formulações durante 40 dias. Após o tratamento, 50% dos animais foram eutanasiados e submetidos a análises (histológicas, parasitológicas, moleculares) e os demais permaneceram sob observação por mais 20 dias, e então foram também eutanasiados e obtidas as amostras para análises. Os animais que receberam o tratamento com hidrogel+extrato (GelEpMeOH) apresentaram pouco aumento de volume de lesão, menor número de ulcerações, e pouca carga parasitária após os 40 dias de tratamento. Aspectos histológicos revelaram menos infiltrado inflamatório. Os animais que receberam tratamento com emulsão+fração (EmulFr2) tiveram uma progressão e depois um declínio da lesão e mostraram baixa carga parasitária nas análises. O grupo que recebeu o tratamento com antimonial (medicamento padrão para LT) mostraram redução na lesão e controle de ulcerações, além de baixa carga parasitária ao fim do tratamento, mas os animais que permaneceram por mais 20 dias mostraram altos valores de concentração parasitária. Os resultados apontam para uma possível terapia alternativa para LT.

Palavras-chave: Produtos naturais, leishmaniose tegumentar, tratamento tópico.

## ABSTRACT

The cutaneous leishmaniasis (CL) is endemic in Brazil, although its occurrence is reported on five continents. The etiologic agent is *Leishmania* gender protozoa, and reported seven that can cause disease in humans. The treatments of first and second choice are often ineffective with many severe side effects and require parenteral administration. These facts motivate the search for new drugs or natural active ingredients and new forms of administration is also being studied. This study aims to evaluate the effects of topical treatments using hydrogels and emulsion containing active extract and active fraction of *Libidia ferrea*, native species from Brazil. For the study, experimental groups were used hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculated with *L. (L.) amazonensis* the snout region with the formulations and treated for 40 days. After treatment, 50% of the animals were euthanized and subjected to tests (histological, parasitological, molecular) and the others remained under observation for 20 days, then were euthanized and also obtained samples for analysis. The animals that received treatment with hydrogel + extract (GelEpMeOH) showed little increase in lesion volume, fewer ulcers, and low parasitic load after 40 days of treatment. Histology revlaram less inflammatory infiltrate. The animals were treated with emulsion + fraction (EmulFr2) had an increase and then a decrease of the lesion and showed low parasite load in the analysis. The group that received treatment with antimony (standard drug for LT) showed a reduction in the lesion and control ulcerations, in addition to low parasitic load to the end of treatment, but the animals that remained for over 20 days showed high levels of parasitic concentration. The results point to a possible alternative therapy for CL.

Keywords: Natural products, cutaneous leishmaniasis, topical treatment

## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, sua transmissão ocorre de forma vetorial através da fêmea de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Neves *et al.* 2005). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Gontijo *et al.* 2003).

Os medicamentos utilizados atualmente contra a Leishmaniose são os antimônios pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ) como droga de primeira escolha, pentamidina e anfotericina B como segunda escolha. No entanto a terapia convencional vem demonstrando duas grandes problemáticas que estão contribuindo com a resistência dos pacientes para o tratamento, por serem de administração parenteral, o que exige a participação do enfermo, e como muitos abandonam o tratamento, uma outra dificuldade vem a ser a eficácia limitada, apresentando inúmeras reações adversas, como insuficiência renal aguda, hipotensão e hipopotassemia (Brasil, 2010; Ferreira *et al.*, 2012; Silva-Lopez, 2010).

A necessidade de tratamentos com maior eficácia e segurança vem estimulando pesquisas com produtos naturais de plantas com atividade antileishmania, uma vez que os vegetais possuem uma diversidade química de metabólitos secundários estruturalmente únicos. No Brasil, estudos com produtos naturais têm mostrado também o potencial de substâncias e óleos obtidos de espécies encontradas no país. Atividade leishmanicida foi detectada em benzofenonas preniladas isoladas de *Garcinia brasiliensis* (Pereira *et al.* 2010) e também em óleo de copaíba extraído de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (Santos *et al.* 2008).

Uma mistura de alcaloides extraídos de *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) mostrou atividade inibitória em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em sistemas *in vitro* (Rodríguez *et al.* 2008). Alcalóides oxoaporfínicos isolados de *Annona mucosa*, assim como, extratos de folhas e sementes desta espécie também apresentaram resultados de inibição *in vitro* em promastigotas e amastigotas de três espécies de *Leishmania* (Lima, *et al.* 2012).

A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea*, árvore nativa da região Amazônica, apresenta ampla distribuição e propriedades econômicas e também farmacológicas. Estudos químicos e farmacológicos de extratos obtidos de *L. ferrea* tem demonstrado seu potencial biológico anti-inflamatório (Carvalho *et al.* 1996), bactericida, cicatrizante, agente hipoglicemiante e antioxidante (Batubara *et al.*, 2009), e também mostrou inibição do crescimento *in vitro* de *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* (Cortez, 2004; Falcão, 2010, Wyrepkowski *et al.*, 2015).

Além do estudo da ação dos produtos naturais no tratamento da leishmaniose, o desenvolvimento de formulações tópicas seria um método alternativo para o tratamento da leishmaniose cutânea. As vantagens da utilização do tratamento tópico incluem evitar o metabolismo hepático de primeira passagem, impedir a exposição às condições químicas e biológicas do trato gastrointestinal, menores níveis de fármacos no plasma e o conforto do paciente na aplicação (Zanchetta, 2009).

Os programas de desenvolvimento de fármacos são estimulados pela facilidade em reproduzir a infecção por *Leishmania* no modelo animal apropriado (Rondon, 2011), sendo o hamster (*Mesocricetus auratus*) um modelo experimental susceptível que pode produzir lesões quando infectado por *L. (L.) amazonensis*.

## **METODOLOGIA**

### **Preparação das Formulações tópicas**

Para o estudo foram preparadas duas formulações tópicas distintas, sendo uma formulação constituída por hidrogel e a segunda, uma emulsão óleo/água.

A formulação constituída por hidrogel foi preparada sob metodologia confidencial e será designada por (**GelEpMeOH**). O placebo (**GelPla**) consistiu nos excipientes sem adição do princípio ativo.

A emulsão óleo-água foi preparada pelo método de inversão de fases, utilizando propilenoglicol e miristrato de isopropila em água deionizada, e foram adicionados o princípio Fr-2 (**EmulFr2**). A emulsão contendo somente os excipientes foi considerada o placebo do experimento (**EmulPla**).

Estas formulações estão em processo de patenteamento.

### **Origem e Manutenção dos parasitas**

Utilizou-se a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2006/IM5584), mantida e criopreservada no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Saúde Ambiente e Sociedade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os parasitas são cultivados em meio Novy-McNeal-Nicolle (NNN) e a cultura expandida em meio RPMI 1640 (Himedia) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e gentamicina (40 mg/mL), para criopreservação.

### **Origem e infecção dos animais**

Os animais utilizados foram 36 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e adultos provenientes e mantidos no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, mantidos em gaiolas em salas condicionadas com fotoperíodo, em condições de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê e Ética em Pesquisa Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA-INPA), com a aprovação do projeto sob o número de protocolo 009/2012.

Os animais foram separados nos grupos experimentais, sendo infectados no focinho com o volume de 0,1 mL de formas promastigotas de fase final logarítmica de *L. (L.) amazonensis* ( $1,0 \times 10^6$  parasitas/mL) provenientes de cultura em meio NNN. Os animais permaneceram sob observação até o aparecimento das lesões para o início dos estudos experimentais.

### **Delineamento experimental**

Foram utilizados 36 hamsters 24 dias após inoculação com *L. (L.) amazonensis* na região do focinho, separados nos seguintes grupos Tratamento e controle: 1- Tratamento: (i) **GelEpMeOH**; (ii) **GelPla**; (iii) **EmulFr2**; (iv) **EmulPla**, (v) **Glucantime®** (20 mg/Sb<sup>V</sup>/Kg/dia) intramuscular; e 2 - Controle negativo sem tratamento. Os grupos que receberam tratamento tópico, este foi aplicado diariamente (uma vez a dia) a dose de 50 mg de formulação/animal na lesão (focinho). O tratamento foi aplicado a todos os animais dos grupos durante 38 dias consecutivos. Após o fim do tratamento, 50% dos animais de cada grupo foram eutanasiados para coleta de amostras. Os demais 50% permaneceram sob

observação por mais 20 dias, sem receber nenhum tratamento. Após este período de 20 dias, foram eutanasiados para coleta de material biológico, como esquematizado na figura 54.



Figura 35 - Cronograma esquemático de tratamento tópico em experimentação animal

**Avaliação clínica:** todos os animais dos grupos experimentas foram submetidos a aferição diária dos valores do volume total da lesão (comprimento, largura e altura) utilizando paquímetro digital (Zaas® Precision) para análise da progressão da lesão. Os dados numéricos foram registrados, tabelados e analisados estatisticamente. As lesões foram fotodocumentadas para análise da evolução morfológica macroscópica.

**Eutanásia:** Os animais foram eutanasiados com Euthanyle® (Pentobarbital sódico – Difenilhidantoina sódica), de acordo com a legislação para uso de animais de experimentação e aprovado pela comissão de ética animal do INPA (CEUA).

**Quantificação de parasitos por impressão em lâminas:** Uma amostra de tecido seccionado da área da lesão de cada animal foi utilizada para impressão em lâminas de vidro. Para cada animal experimental, foi realizada a impressão em duplicata. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A densidade de parasitas (amastigotas) e de macrófagos infectados foi estimada por análise em microscopia óptica sob óleo de imersão (1000 X) e ao menos 25 campos de cada lâmina foram contados e registrados. Foram considerados campos para contagem os que possuíam ao menos cinco macrófagos. As análises foram realizadas por profissionais não envolvidos na experimentação, seguindo modelo de estudo duplo-cego. Os dados foram tabelados, e foram calculadas a média de amastigotas e a média de macrófagos infectados para cada animal da experimentação. A relação percentual de parasitas foi obtida pelo índice  $\% \text{parasitas} = \bar{X} \text{ amastigotas} \frac{100}{X_{\text{máx}}}$

**Viabilidade de parasitas em meio de cultura:** cultura foi preparada a partir de amostras de lesões obtidas de cada animal experimental. Uma amostra foi seccionada longitudinalmente da área da lesão após a tricotomia e assepsia dos animais. A amostra foi imersa em salina contendo gentamicina (40 mg/mL) e após, transferidas assepticamente para meio NNN e mantidas por oito dias a 25 ° C. As culturas foram determinadas como negativas quando não havia a presença de parasitas após o período de incubação. Em caso positivo, a concentração de parasitas presentes foi semi-quantificada de acordo com o número logarítmico de células presentes, sendo considerados os valores 1- de 1 até 10 parasitas; 2 - entre 10 a 100 parasitas e 3 – maior que 100 parasitas por campo.

**Análise histopatológica:** amostras dos tecidos lesionados foram seccionadas e os fragmentos foram transferidos para formol tamponado a 10%, e posteriormente, submetidos ao processamento histológico para microscopia de luz. As lâminas histológicas obtidas

foram coradas com hematoxilina-eosina. A confecção e leitura das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Morfologia da UFAM.

**Quantificação parasitária por q-PCR:** Fragmentos da lesão foram seccionados, com auxílio de lâmina de bisturi, pesados, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 10 mg. Essas amostras foram transferidas para microtubos (Eppendorf®) previamente identificados e em seguida foi realizado o procedimento de extração do DNA utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguido as recomendações do fabricante. Foram adicionados 600 µL de solução de lise nuclear, homogenizados (Agitador tipo vortex – Modelo VTX-2500-220 Biomixer) por 20 segundos. Após homogeneização, em cada tubo foi adicionado 17,5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e incubado por uma hora a 65°C. Após este período, foram adicionados 3 µL de RNase e realizado a homogeneização e incubação por 30 minutos em banho seco (AccuBlock™ Digital Dry Baths) a 37°C. Após incubação, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos e foi adicionado 200 µL de solução de precipitação de proteínas, e posteriormente centrifugadas por 4 minutos a 13.000 rpm (Microcentrífuga Hettich Mikro 120 - Modelo C1204). O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600 µL de isopropanol. O tubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 600 µL de solução de etanol 70%. Posteriormente foi realizada nova centrifugação a 13.000 rpm, e novamente descartado o sobrenadante. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% remanescente e em seguida foram adicionados 100 µL de solução de re-hidratação a overnight a 4°C. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C, até o momento da análise pelo método molecular. Para a realização do q-PCR, foram preparadas reações com um volume final de 25 µL com

oligonucleotídeos a 100 nM e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Foram adicionados 5 µL de DNA por amostra e cada amostra corrida em triplicata. Para o experimento foi obtida uma curva padrão, utilizada como parâmetro para análise das amostras processadas. O termociclador utilizado foi o modelo Rotor-Gene Q (QIAGEN). O cálculo dos números absolutos de cópias para amostras de cada ensaio foi feito levando-se em consideração a eficiência ( $E = 1,19248$  ( $* = 10^{(-1/m)} - 1$ )) da reação.

**Análise estatística:** Os dados registrados dos procedimentos da avaliação do efeito do tratamento foram tabelados e analisados pelo programa GraphPad 6.0 (Prism®). As análises empregaram o método *two-way* ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança.

## RESULTADOS

Os parâmetros analisados para avaliar os efeitos dos tratamentos aplicados por administração tópica nas lesões causadas por *Leishmania (L.) amazonensis* em hamsters permitiram o acompanhamento da evolução clínica durante o tratamento, além da influência nos parasitas e tecidos no fim do tratamento e após um período de 20 dias sem a aplicação de formulações. A evolução clínica dos volumes das lesões é um aspecto importante a ser avaliado, uma vez que a leishmaniose cutânea (LC) pode produzir nos hamsters infectados o desenvolvimento de lesões histiocitárias, com amplo crescimento do tecido similar a lesões benignas que evoluem de forma crônica para úlceras ou lesões nodulares. A espécie *L. (L.) amazonensis* tem entre suas características, a capacidade de produzir lesões focais com numerosos macrófagos contendo no citoplasma grande vacúolo repleto de amastigotas, esse aspecto histiocitomatoide grande e volumoso acarreta lesões cutâneas exacerbadas em hamsters. Este experimento mostrou um aumento de 445,94% no volume total das lesões

nos focinhos dos hamsters do grupo controle em relação ao dia 0 do tratamento (24 dias pós-infecção).

A avaliação dos volumes das lesões cutâneas dos focinhos em função do tempo de tratamento mostrou que quando comparado a média do grupo que recebeu tratamento com o antimônio pentavalente Glucantime® (20mg/SbV/kg/dia) intramuscular com a do grupo controle (sem tratamento), há diferença estatística a partir do 14º dia de tratamento, com  $p = 0,0138$ . Esta diferença entre o tamanho das lesões aumenta (figura 36), alcançando  $p < 0,001$  a partir do 20º dia de tratamento. Os animais continuaram a receber o tratamento com o antimônio até o 38º dia de tratamento, mesmo ocorrendo a redução após 20 dias de tratamento. No final do tratamento, observou-se uma redução de 43,42% do volume das lesões em relação ao início do tratamento.

O grupo que recebeu tratamento tópico com GelEpMeOH mostrou uma constância na média dos volumes das lesões, não permitindo o aumento como observado no grupo não tratado (figura 36). Assim como o grupo tratado com Glucantime®, há diferença estatística entre os volumes das lesões do grupo GelEpMeOH e grupo sem tratamento a partir do 14º dia, com  $p = 0,0218$ . As diferenças estatísticas entre o grupo tratado com GelEpMeOH e o grupo sem tratamento aumentam com a continuidade do tratamento, até alcançar valores de  $p < 0,001$  a partir do 24º dia de tratamento. O grupo de tratamento com GelEpMeOH apresentou 42,78% de redução do volume da lesão após 38 dias de tratamento em relação ao primeiro dia de tratamento (24º dia pós-infecção).

Porém, o grupo que recebeu o tratamento tópico com o excipientes do gel (GelPla) também mostrou diferenças entre as médias das lesões quando comparadas com o grupo controle, apresentando diferença estatística a partir do 20º dia de tratamento, com  $p = 0,0178$ . Os valores médios das lesões do grupo GelPla assumem uma posição intermediária no gráfico (figura 36), apresentando diferença entre o grupo controle e os grupos tratados

com GelEpMeOH e com antimonial (Glucantime®). A diferença estatística entre o grupo GelEpMeOH e o grupo GelPla ocorreu após o 30º dia de tratamento, com  $p = 0,0411$ , e esta diferença aumentou com o tempo de tratamento, alcançando valor de  $p = 0,0015$  no último dia de tratamento (38º dia). No último dia do tratamento, a média das lesões do grupo GelPla correspondiam a 241% de aumento em relação ao dia 0 do tratamento.

Sumarizando estes resultados em relação a evolução clínica durante o tratamento, verifica-se que as lesões dos animais do grupo que não recebeu nenhum tratamento aumentaram gradativamente durante o tempo experimental, alcançando índices superiores a 400% de aumento. As lesões do grupo que recebeu tratamento tópico com GelPla também aumentou, porém em proporções menores que no grupo controle, com aumento de 2,4 vezes seu volume total. Já as lesões dos grupos tratados com GelEpMeOH e Glucantime® reduziram seu volume total em mais de 40%.

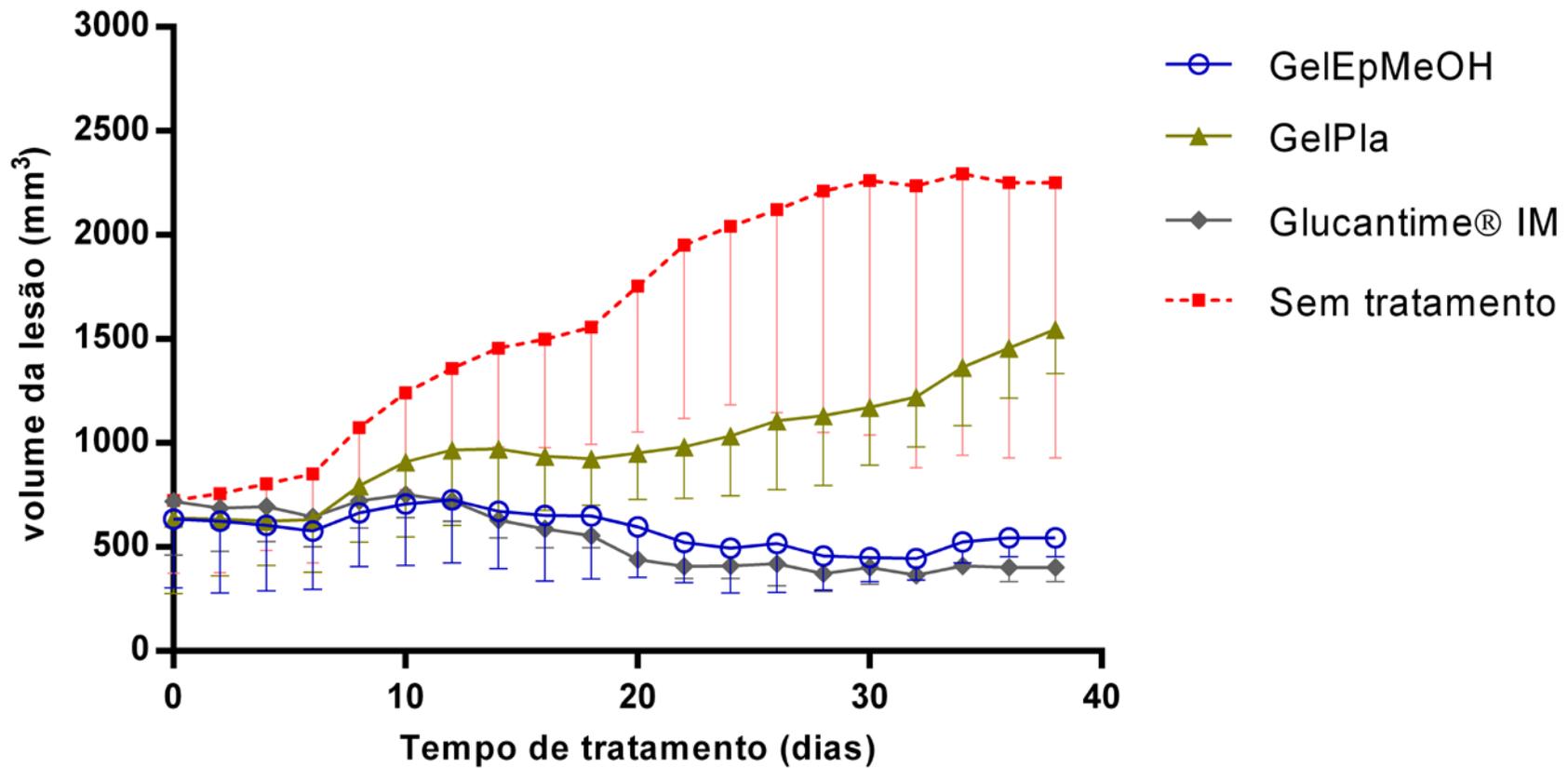


Figura 36 - Evolução clínica do volume das lesões de *Mesocricetus auratus* inoculados no focinho com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante o tratamento experimental com hidrogéis de uso tópico e Glucantime® intramuscular. Controle: animais inoculados sem tratamento

Quanto ao aspecto clínico das lesões, há presença de ulceração com crosta de aspecto melicérico em todos os animais que compõem o grupo do controle negativo (sem tratamento), mas com diâmetros variados, como se pode visualizar na figura 37. As lesões do grupo que recebeu tratamento com GelEpMeOH continuaram com seu aspecto nodular, ou regressão do nódulo, apresentando um animal com ulceração (16%, 1/6), com formação também de crosta. Os animais tratados com GelPla apresentaram lesões nodulares no início mas 67% (4/6) das lesões apresentaram ulceração. O grupo tratado com antimonial intramuscular (Glucantime®) não apresentou ulceração até o fim do tratamento.

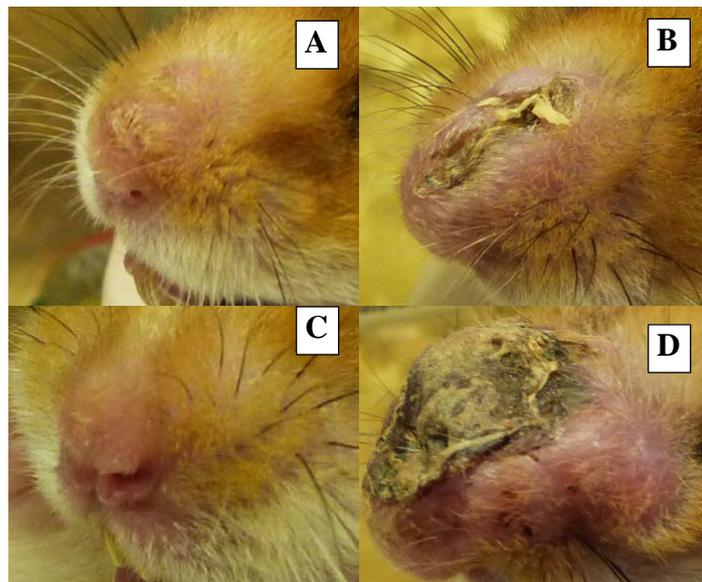


Figura 37 – Aspecto clínico das lesões de *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no 30º dia de tratamento experimental. A – Grupo tratado com GelEpMeOH. B – Grupo tratado com GelPla. C- Grupo tratado com Glucantime® (IM) (20 mg/kg/dia) D – Grupo infectado e não tratado.

Os resultados do tratamento tópico com emulsão contendo 1% da Fração2-DCM (EmulFr2) em hamsters infectados mostrou resultados bem diferentes do tratamento com

GelEpMeOH. Quando analisados os volumes das lesões ao decorrer do tempo de tratamento, é possível observar um aumento do volume total de 183% entre o primeiro e o 16º dia de tratamento (figura 38). Após este período, o volume das lesões começa a diminuir gradativamente com a continuidade do tratamento. No final do tratamento (38º dia) é possível constatar a redução de 43% do volume das lesões quando comparado com o 16º dia.

As análises mostraram que há diferença estatística entre o volume das lesões do grupo tratado com EmulFr2 e o grupo controle negativo a partir do 22º dia de tratamento, com valor de  $p = 0,0384$ . As diferenças estatísticas aumentam e no 28º dia verifica-se que  $p < 0,0001$  quando comparados estes dois grupos.

No 28º dia também se pode constatar a diferença estatística entre o grupo de recebeu apenas a EmulPla do grupo EmulFr2 ( $p = 0,0496$ ). Não há diferença estatística entre o grupo não tratado e o grupo tratado com EmulPla. As diferenças visualizadas no gráfico (figura 38) são apenas de ordem numérica. Porém, há diferença entre o volume das lesões do grupo EmulPla e o grupo tratado com antimonial a partir do 22º dia de tratamento ( $p = 0,0283$ ) e progrediu até o 38º dia ( $p = 0,0006$ ). As lesões de hamsters tratados somente com o placebo (excipientes da emulsão) mostraram um aumento de 253,87% do volume total da região do focinho durante o tratamento.

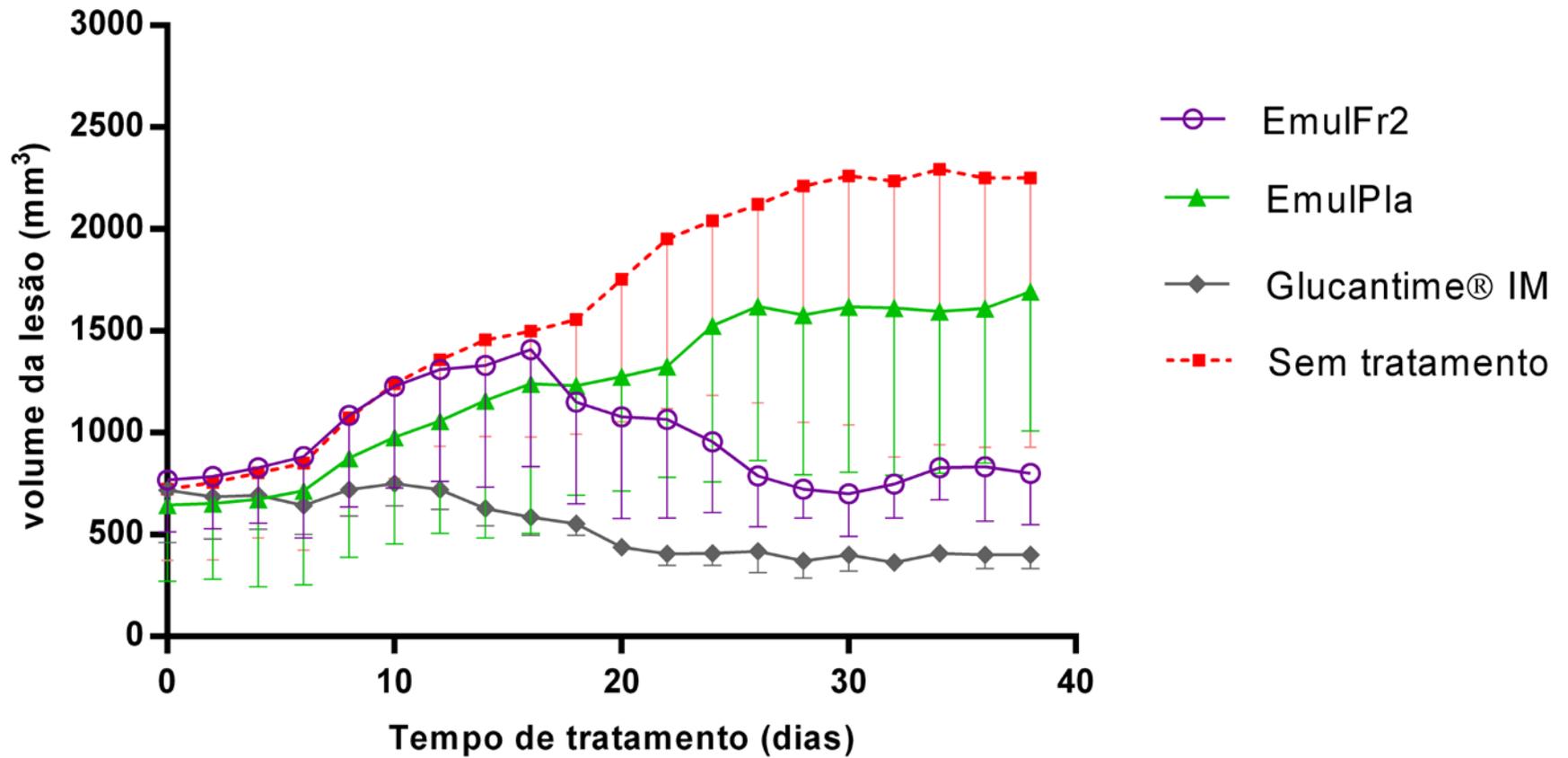


Figura 38 - Evolução clínica do volume das lesões de *Mesocricetus auratus* inoculados no focinho com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, durante o tratamento experimental com emulsões de uso tópico e Glucantime® intramuscular. Controle: animais inoculados sem tratamento tópico.

A verificação dos aspectos clínicos mostrou que até o 20º dia o grupo de tratamento com EmulFr2 havia a ocorrência de 66% de lesões com úlceras nos animais infectados deste grupo. Porém, o diâmetro das lesões e das úlceras diminuíram com o passar do tratamento, e no 38º dia o percentual de lesões ulceradas decaiu para 50%, devido a cicatrização da úlcera de um (1) animal. No grupo tratado com a emulsão contendo somente os excipientes (EmulPla) também ocorreu 66% de lesões ulceradas e estas persistiram até o final do experimento. Aspectos clínicos das lesões dos grupos estão apresentados na figura 39.



Figura 39 – Aspecto clínico das lesões de *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no 30º dia de tratamento experimental. A – Grupo tratado com EmulFr2. B – Grupo tratado com EmulPla. C- Grupo tratado com Glucantime® (IM) (20 mg/kg/dia) D – Grupo infectado e não tratado.

Para a avaliação dos parâmetros parasitológicos, os quais objetivam mensurar quantitativamente aspectos da concentração parasitária na região da lesão, os resultados

foram organizados para comparar todos os tratamentos em dois tempos experimentais distintos: *i*) 40 dias foi considerada a avaliação do material (lesão) coletado 24 horas após a última aplicação do tratamento; *ii*) 60 dias foi considerada a avaliação do material (lesão) coletado após 20 dias da última aplicação do tratamento.

A viabilidade parasitária verificada pela cultura em NNN foi semi-quantitativa, e revelou a presença de maiores *scores* de parasitas flagelados viáveis de nas culturas oriundas de fragmentos do grupo sem tratamento ( $score > 2$ ) para as análises de 40 dias (figura 40). Neste tempo de 40 dias, o menor *score* foi do controle positivo (tratamento com antimonial), o qual não apresentou parasitas viáveis após 8 dias de incubação do meio de cultura. Os grupos de tratamento GelEpMeOH e GelPla apresentaram valores médios do *score* abaixo de 1,0. A viabilidade parasitária verificada após 40 dias de tratamento com a EmulFr2 e EmulPla mostraram a média de 1,16.

Entretanto, quando amostras foram obtidas de animais após 20 dias sem tratamento, tempo de 60 dias, os resultados da avaliação da viabilidade apresentaram diferentes proporções. O grupo sem tratamento continuou com alta viabilidade ( $score > 3,0$ ) de parasitas, porém ocorreu presença de parasitas viáveis no grupo tratado com Glucantime®, com  $score = 2,0$ . Resultados aproximados de  $score 2,0$  foram observados nos grupos GelEpMeOH, GelPla e EmulPla (figura 40). Porém, no grupo que recebeu tratamento tópico com EmulFr2, constatou-se uma menor viabilidade (média do  $score = 0,33$ ) de parasitas, quando comparado com os demais tratamentos e quando comparado com as amostras obtidas em 40 dias ( $score = 1,16$ ).

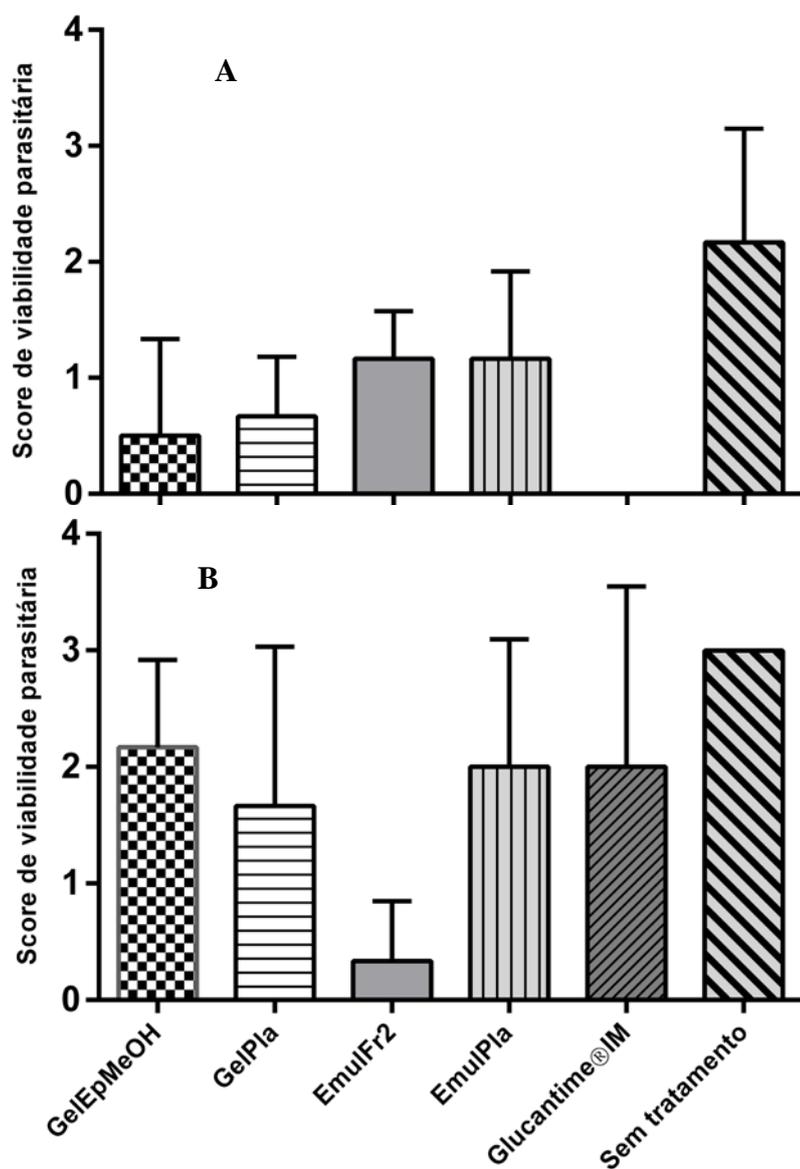


Figura 40 – *Score* de parasitas viáveis visualizados em cultura Novy-McNeal-Nicolle (NNN) após oito dias de incubação a 25° C provenientes de fragmentos de lesões dos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* dos grupos experimentais. Considera-se 0 = ausência; 1 = 1 a 10 parasitas/campo; 2 = 10 a 100 parasitas/campo e 3 = > 100 parasitas/campo. A – 40 dias de experimentação. B – 60 dias de experimentação.

A avaliação da carga parasitária pela avaliação dos campos contendo material biológico originado das impressões em lâminas foi utilizada como parâmetro para determinar a presença do parasita na forma intracelular e sua abundância relativa nas diferentes amostras (figura 41).

As amostras obtidas após 40 dias de tratamento mostraram diferenças estatísticas nas abundâncias relativas do número de amastigotas por campo (figura 60) entre o grupo GelEpMeOH e GelPlacebo ( $p = 0,0002$ ), o grupo GelEpMeOH e o grupo sem tratamento ( $p < 0,0001$ ), o grupo EmulFr2 e grupo EmulPla ( $p = 0,0050$ ) e grupo EmulFr2 versus grupo sem tratamento ( $p < 0,0001$ ). O grupo que recebeu tratamento com antimonial (Glucantime®) também apresentou diferença estatística em relação a abundância relativa de amastigotas do controle negativo ( $p < 0,001$ ). Sumarizando estes resultados, os valores médios visualizados para os grupos tratados com GelEpMeOH, EmulFr2 e Glucantime® mostraram valores bem inferiores aos encontrados em seus respectivos placebos e no controle negativo.

Quando avaliado o percentual de macrófagos infectados por campo analisado, nas amostras obtidas após 40 dias, observa-se que também há diferença estatística entre GelEpMeOH e GelPla ( $p < 0,0001$ ), GelEpMeOH e grupo controle negativo ( $p < 0,0001$ ), EmulFr2 e EmulPla ( $p = 0,0002$ ) e EmulFr2 e controle negativo ( $p < 0,0001$ ). O grupo tratado com Glucantime® mostrou diferença estatística do grupo que não recebeu tratamento ( $p = 0,0086$ ).

Após 60 dias de avaliação (20 dias pós-tratamento), a abundância de amastigotas persistiu com valores baixos ( $< 3,0\%$ ) nas amostras obtidas dos grupos GelEpMeOH e EmulsFr2, os quais mostraram diferenças estatísticas quando comparados aos seus placebos e ao grupo que não recebeu tratamento. Porém, em relação ao percentual de macrófagos

infectados, apenas o grupo GelEpMeOH mostrou diferença entre GelPla ( $p = 0,005$ ) e o grupo que não recebeu nenhum tratamento ( $p = 0,0004$ ).

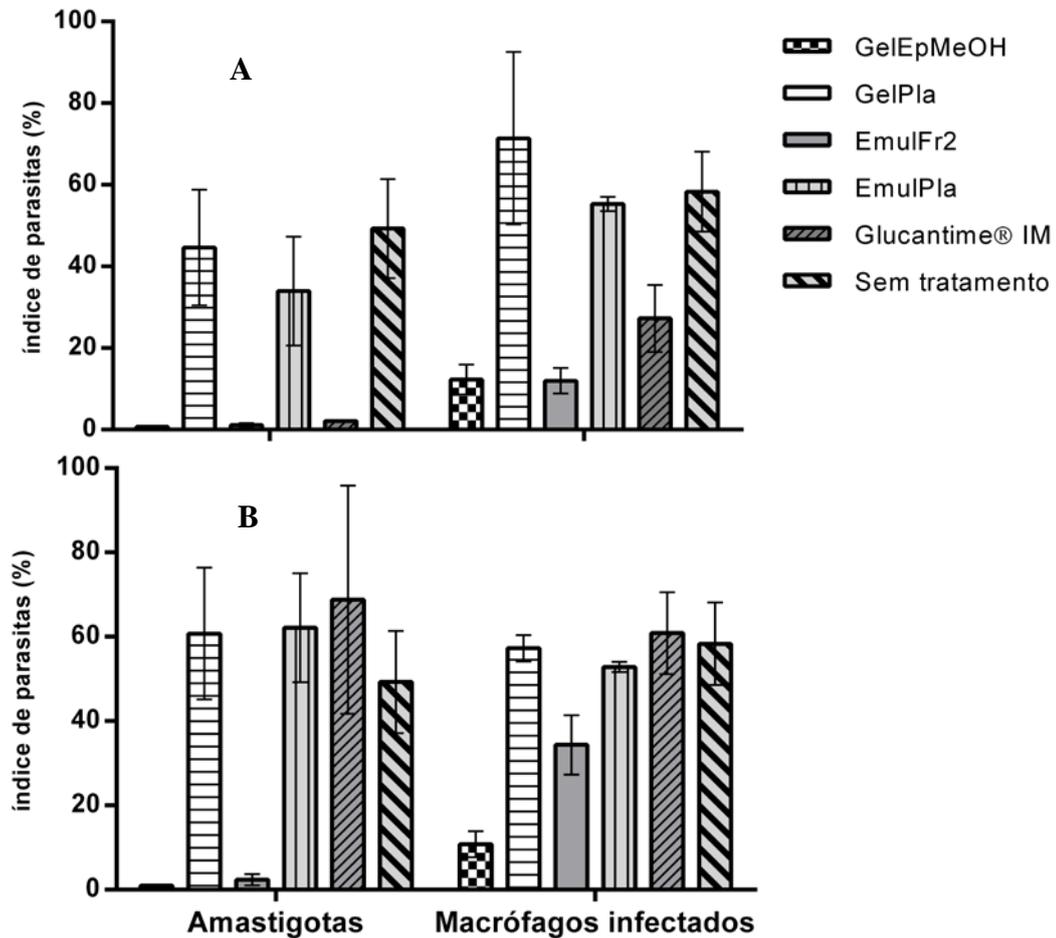


Figura 41 – Índices da abundância relativa de amastigotas e do percentual de macrófagos infectados visualizados e estimados por microscopia óptica (1000X) nas impressões em lâminas dos tecidos oriundos dos locais de lesão de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, nos grupos experimentais. A – 40 dias de experimentação. B – 60 dias de experimentação.

A quantificação parasitária pelo método de *real-time* PCR (q-PCR), a qual baseia-se na detecção do DNA de *Leishmania* presente nas lesões, mostrou que todos os grupos que receberam algum tratamento apresentaram diferenças estatísticas na concentração de DNA de parasita quando comparados ao grupo sem tratamento das amostras obtidas no 40º dia de tratamento (figura 42). Os grupos que receberam tratamento com GelEpMeOH e EmulFr2 apresentaram as menores concentrações ( $< 0,01$ ), apresentando  $p = 0,0276$ . Os placebos mostraram também diferença em relação ao grupo sem tratamento ( $p = 0,0279$ ). O grupo tratado com antimonial pentavalente (Glucantime®) apresentou valores inferiores a 1,62 de carga parasitária e  $p = 0,027$  em relação ao grupo sem tratamento.

Porém, verificou-se uma mudança nos perfis na concentração parasitária nas amostras provenientes dos animais que permaneceram por 20 dias ao fim do tratamento (60 dias). Os valores médios aumentaram para o grupo tratado com Glucantime® ( $> 14.000$ ) e diminuíram para o grupo não tratado (287). Os menores valores encontrados foram para o grupo GelEpMeOH ( $< 4,0$ ) e grupo GelPla (5,88). Todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas quando comparado com o grupo tratado com Glucantime® ( $p < 0,05$ ). A curva de quantificação obtida por q-PCR com do grupo tratado com Glucantime® - controle positivo.

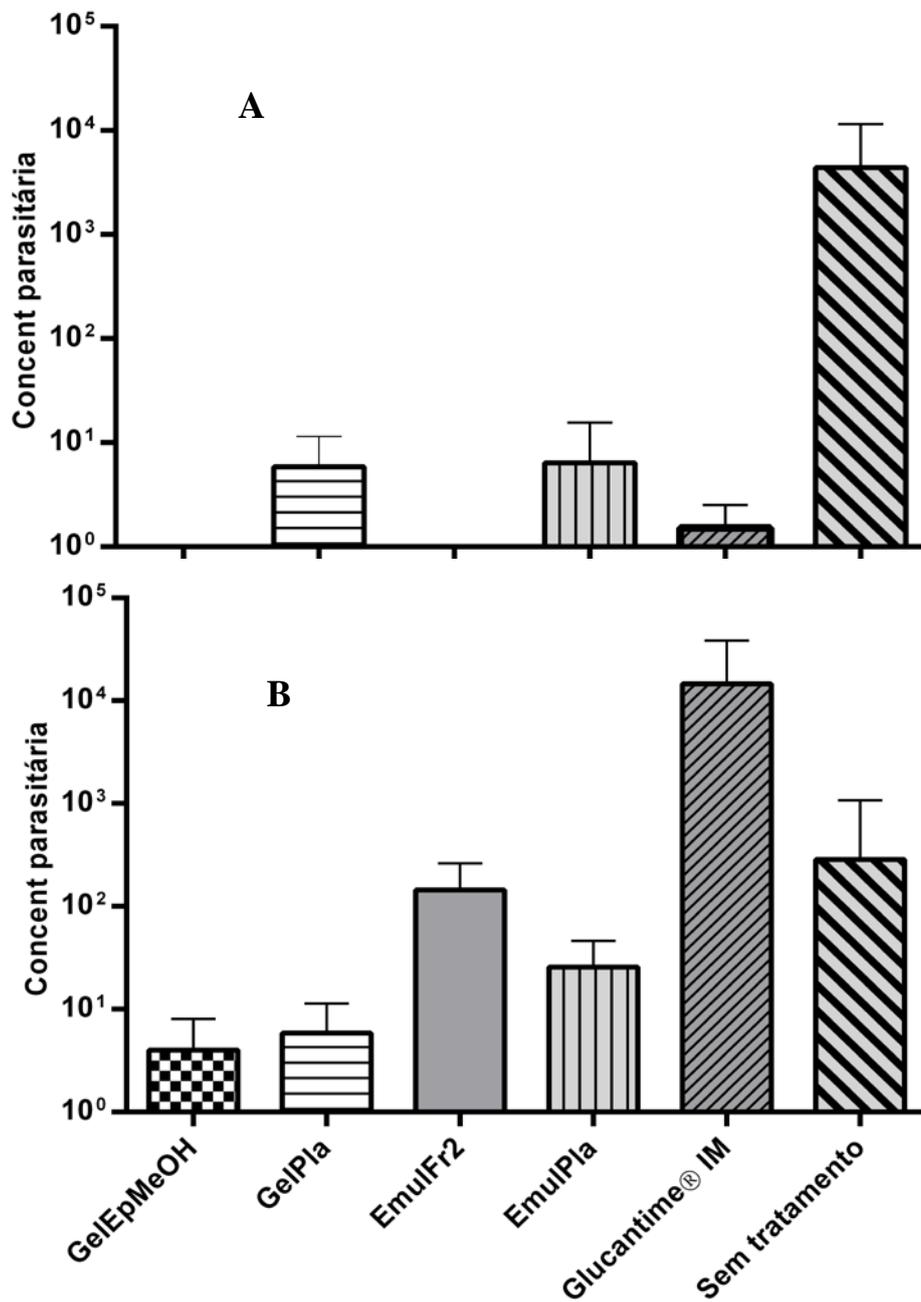


Figura 42 - Concentração de DNA quantificado por q-PCR de biópsias de lesões de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e que receberam diferentes tratamentos. A – 40 dias de experimentação. B – 60 dias de experimentação.

O padrão inflamatório dérmico e população celular foram estimados histologicamente em cortes corados com HE. O infiltrado inflamatório foi mensurado em cruzes como a seguir; (-), sem infiltrado inflamatório; (+), foco isolado de células inflamatórias; (++) , áreas de infiltrado inflamatório isolados ou coalescentes; (+++), áreas de infiltrado inflamatório difuso (Solano-Gallego et al. 2004).

Nos fragmentos oriundos do controle negativo (grupo sem tratamento), o padrão de lesão mais comum foi dermatite perifolicular, principalmente ao redor do istmo capilar (figura 43). O infiltrado inflamatório se estende até a região da glândula sebácea, não observado na figura, obliterando-a em alguns casos. Infiltrado difuso ou perivascular normalmente acompanhava a inflamação perifolicular. A intensidade do infiltrado inflamatório (+++) é demonstrado na figura 44 onde observa-se sua invasão na borda do pericôndrio fibroso da cartilagem nasal. Os Macrófagos foram predominantes, com presença discreta de linfócitos e plasmócitos. Neutrófilos isolados também foram observados em algumas laminas.

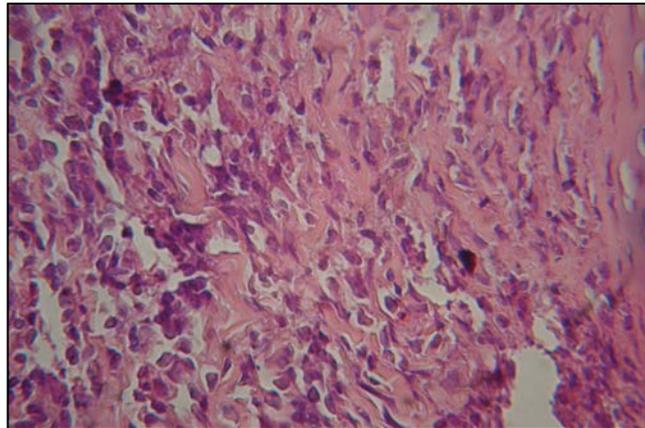


Figura 43 - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não tratado. Controle (-). Dermatite perifolicular focada ao redor do istmo capilar. Dermatite perivascular moderada também observada. HE. Aumento de 112x.

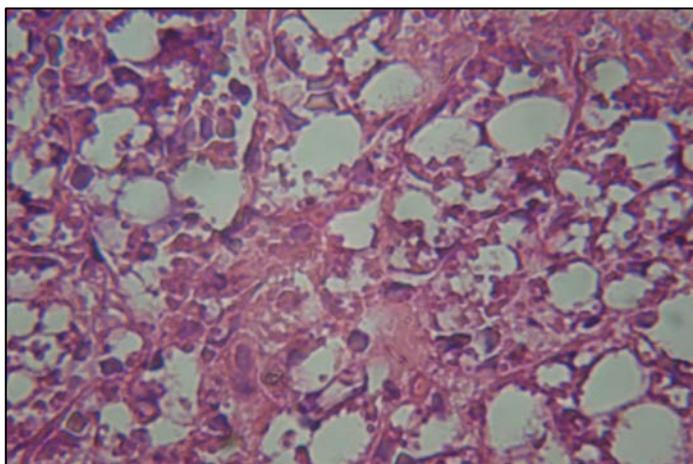


Figura 44 - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* não tratado. Controle (-). Infiltração difusa de células inflamatórias com algumas células epitelioides de permeio. Numerosos amastigotas em meio a infiltrado mononuclear. HE. Aumento de 160x.

Nos animais do grupo tratado com Glucantime® (controle positivo), a dermatite encontrada foi leve, região derme papilar, com baixo infiltrado mononuclear (+) não se estendendo até os folículos pilosos. Adenites sebácea não foi observada nas amostras analisadas (Figura 45).

As amostras obtidas dos animais do grupo GelEpMeOH mostraram leve infiltração de células inflamatórias e ausência de formas amastigotas dos parasitas (figura 47), enquanto que observou-se nas amostras do grupo GelPla há uma intensa e difusa infiltração de células inflamatórias (figura 48). No grupo placebo, há também a presença de infiltração de células epitelioides, linfócitos e neutrófilos além de plasmócitos. Em algumas áreas observa-se adenite da glândula sebácea e área granulomatosa.

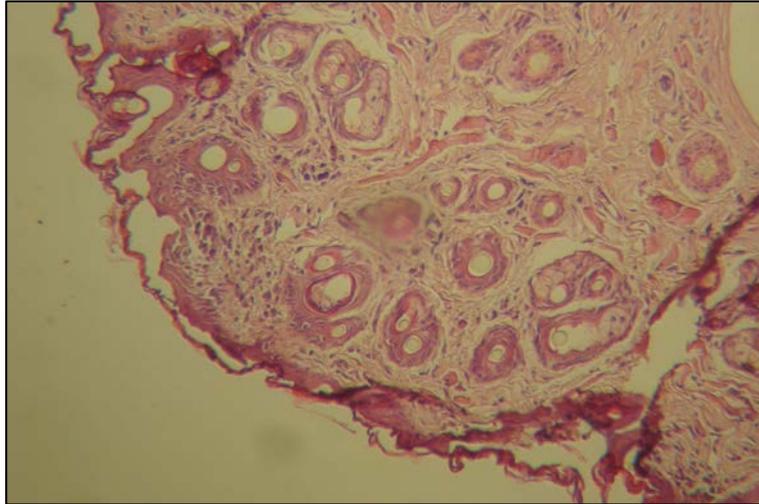


Figura 45 - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratado com Glutantime® (Controle +). Menor infiltração de células inflamatórias (+). Dermatite perifolicular leve e não estendendo as glândulas sebáceas. HE. Aumento de 40x.

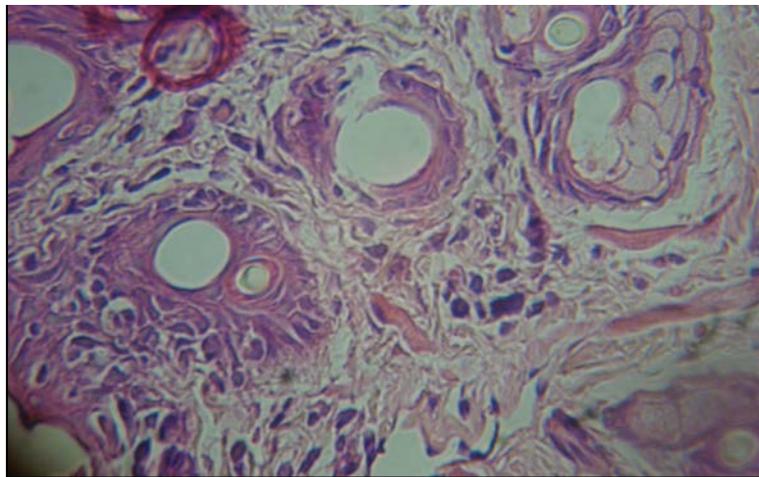
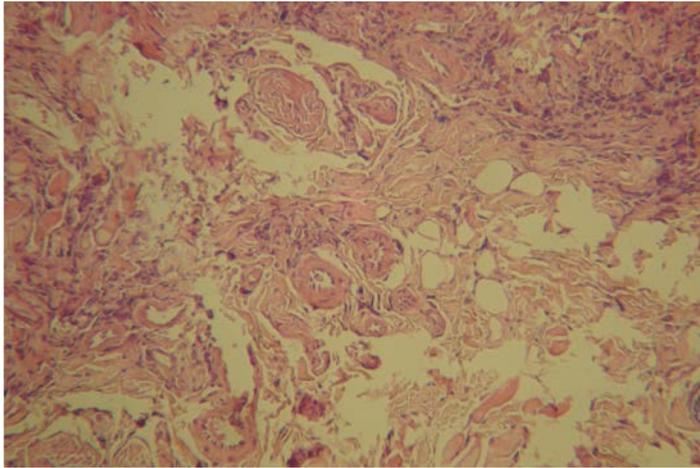
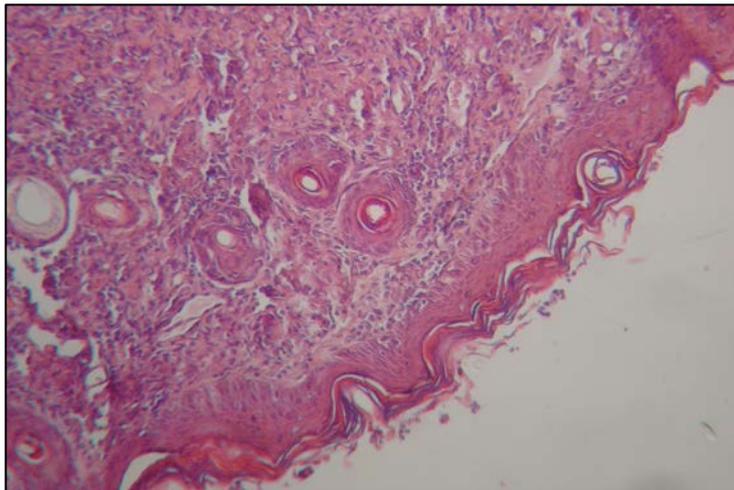


Figura 46 - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratado com Glutantime® (Controle +). Aumento de 112 x.



**Figura 47** - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tratado com GelEpMeOH. Leve infiltração de células inflamatórias (+).



**Figura 48** - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania amazonensis* tratado com GelPla. Intensa e difusa infiltração de células inflamatórias (+++) na derme papilar e reticular se estendendo até folículos pilosos. HE. Aumento de 40x.

As análises histopatológicas das lesões dos animais submetidos ao tratamento com a emulsão contendo a Fr2 (EmulFr2) mostraram moderada infiltração de células inflamatórias (++) na derme papilar e reticular (figura 50). Há também ampla presença de células epitelioides, plasmócitos e neutrófilos. Em algumas áreas é possível observar formas amastigotas do parasita observados dentro de macrófagos ou espalhados no tecido. Porém, no grupo tratado com o placebo (EmulPla), há intensa e difusa infiltração de células inflamatórias (+++). Em algumas áreas observa-se regiões granulomatosas e há presença de infiltração de células epitelioides, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos.

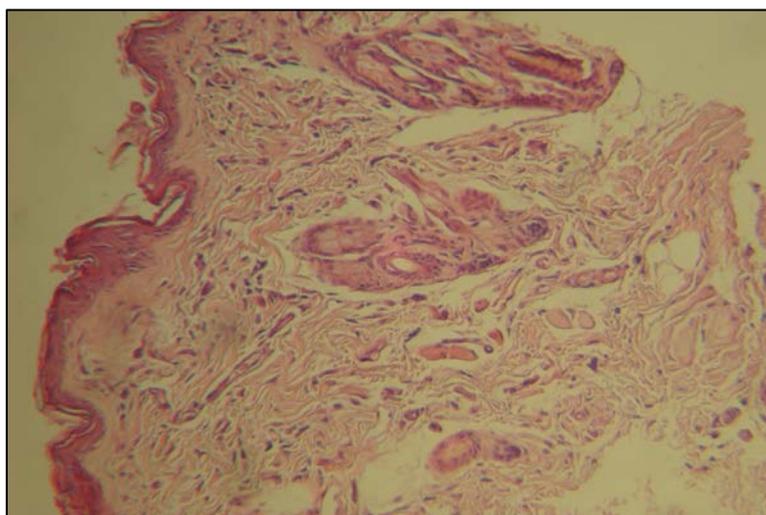


Figura 49 - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania amazonensis* e tratados com EmulFr2. Moderada infiltração de células inflamatórias (++) na derme papilar e reticular. Aumento de 40x.

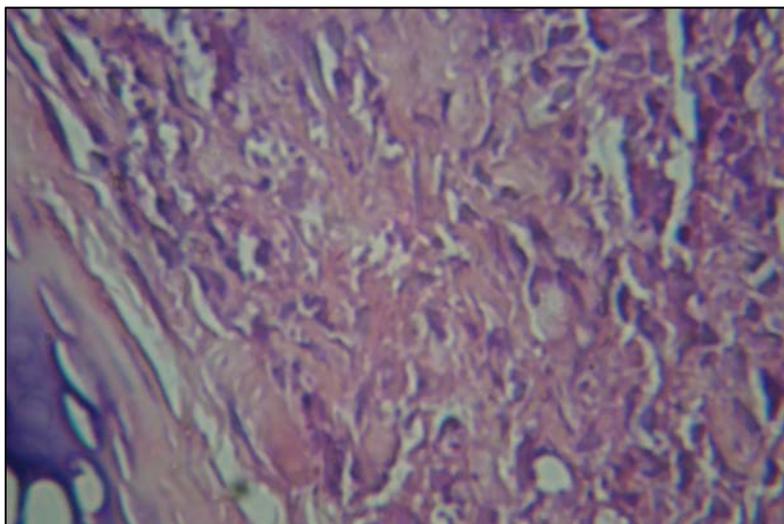


Figura 50 - Fotomicrografia de pele de Golden Hamster. Animal infectado com *Leishmania amazonensis* tratado com EmulPla. Intensa e difusa infiltração de células inflamatórias (+++). Algumas áreas granulomatosas. Presença de infiltração de células epitelioides, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. HE. Aumento de 160x

## DISCUSSÃO

Estudos que buscam novas formas terapêuticas contra a leishmaniose tegumentar avaliam vários parâmetros para determinar a eficácia do composto e sua veiculação (Schwartz *et al* 2014), e este trabalho buscou compreender a ação de duas formulações distintas, contendo uma de caráter mais hidrofílico, e outras mais hidrofóbica.

A comparação entre os resultados clínicos observados entre o grupo tratado com hidrogel com EpMeOH e o grupo sem tratamento mostraram fortes evidências da atividade da formulação sobre o desenvolvimento e evolução das lesões, tanto pelo controle do aumento do volume total da lesão, quanto a outros aspectos clínicos. Nos grupos que receberam o hidrogel, as lesões não apresentaram o aumento do seu volume, com valores

estatísticos significativos quando comparados ao grupo controle, e, ainda, esta evolução foi similar ao grupo que recebeu o tratamento com medicamento padrão (Glucantime<sup>®</sup>). Além, o hidrogel com EpMeOH parece ter produzido ação no impedimento da formação de úlceras nas lesões, de acordo com as avaliações clínicas avaliadas.

Porém, o grupo que recebeu o tratamento com a emulsão contendo Fr-2 apresentou uma evolução clínica da lesão diferente do grupo do hidrogel. A lesão teve progressão nas primeiras semanas do tratamento de ritmo similar ao grupo sem tratamento, e passou a decair após cerca de 15 dias de tratamento, embora não houve redução significativa no número de animais que apresentaram ulceração.

Vários parâmetros foram analisados para permitir um diagnóstico mais preciso da carga parasitária presente nas lesões, tanto no fim do tratamento, quanto após um período sem recebe-lo. Os resultados, em resumo, mostraram que há uma correlação entre os diferentes métodos aplicados (aspecto tecidual/histológico, detecção da presença de DNA parasitário/molecular e aspectos parasitológicos).

O hidrogel EpMeOH apresentou carga parasitária bem inferior aos demais tratamentos, quando analisadas as lesões logo ao fim do tratamento. Porém, teve um aumento, embora ainda menor que no controle negativo e também no grupo tratado com Glucantime<sup>®</sup>, quanto à presença de parasitas após 20 dias sem receber tratamento.

O efeito observado para o hidrogel EpMeOH pode ser explicado pela questão da penetração do principio ativo e sua taxa de difusão, parâmetros que devem ser analisados em futuros trabalhos. A questão da penetração é um dos fatores que determina a eficácia no tratamento da leishmaniose tegumentar, uma vez que o principio ativo deve atuar em tecidos mais profundos da derme, onde estão localizados muitos macrófagos infectados (Garnier e Croft *et al*, 2002). A outra questão relevante é a atividade anti-leishmania intrínseca da

amostra (Schwartz et al 2014), que foi observado para o extrato EpMeOH em sistemas *in vitro* (Capítulo I).

Em relação a características de hidrofobicidade, foi acrescentado em formulações de hidrogel devido a sua característica mais hidrofílica, aumentando a interação com os excipientes da amostra, segundo recomendações da tecnologia farmacêutica (Nagelreiter, Kratochvilova, Valenta, 2015). A concentração utilizada foi maior que em estudos anteriores, tendo em vista que o processo de diluição do princípio ativo influencia consideravelmente também as propriedades terapêuticas da formulação (Nagelreiter, Kratochvilova, Valenta, 2015).

Um estudo empregando hidrogel de quitosana com o antibiótico paromomicina no tratamento da LT experimental também verificou resultados promissores em lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* (Gonçalves *et al.*, 2005). Os hidrogéis usados em tratamentos tópicos possuem flexibilidade similar a tecidos naturais devido ao alto conteúdo de água, o que minimiza a irritação das membranas ou dos tecidos vizinhos ao sítio de aplicação (Koop, 2012).

Os resultados parasitológicos mostraram que a emulsão Fr2 também apresentou eficácia em reduzir a carga parasitária das lesões, tanto quando o hidrogel EpMeOH após os 40 dias de tratamento, e maior eficácia em 60 dias, apresentado baixa carga de DNA do parasita, assim como pela redução nas detecções de parasitas por microscopia óptica. Este resultado é muito promissor, pois os estudos atuais demonstram que produtos naturais com atividade leishmanicida conhecida, como a lapachona (Almeida, 2009) quando avaliados em sistemas *in vivo* utilizando formulações tópicas podem apresentar apenas ação na regressão da lesão, não sendo observados efeitos na concentração parasitária da lesão (Moreno et al., 2015).

As terapias locais são opções mais atrativas, oferecendo uma redução da toxicidade sistêmica e facilidade para o próprio paciente. Mas, quando analisada a eficácia terapêutica para o tratamento da leishmaniose tegumentar de uma maneira mais abrangente, deve-se não apenas verificar a eliminação do parasita, mas olhar de maneira integrada para as questões relacionadas aos aspectos que envolvem as reações anti-inflamatórias e a capacidade cicatrizante, promovendo assim o reparo tecidual e re-epitelização, evitando infecções secundária (Schwartz et al 2014). Assim, este trabalho permitiu verificar qual a atividade frente aos parasitas de forma abrangente e de modo preliminar suas atividades no organismo hospedeiro infectado experimentalmente e indicar um tratamento fitoterápico promissor sob a forma tópica de um hidrogel para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar.

## **CONCLUSÕES**

Os animais tratados com o hidrogel contendo o extrato MeOH de *L. ferrea*, após 40 dias de tratamento, apresentaram redução do volume das lesões, diminuição da inflamação na região das lesões e menor carga parasitária quando comparados com os animais infectados que não receberam tratamento, ou receberam apenas o gel sem o extrato. Os animais que receberam o tratamento com a emulsão Fr-2 apresentaram também redução no volume e na carga parasitária, porém a diminuição da inflamação não foi detectada após o tratamento com esta formulação.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

A busca por novos tratamentos que sejam menos tóxicos e facilmente biodisponíveis para tratar a população mais pobre, geralmente mais afetada pela leishmaniose, é imperativa e os produtos naturais são potenciais fontes de grande variedade de substâncias de atividade biológica (Oliveira, Gilbert, Villas-Boas, 2013). Tendo este paradoxo em vista, muitos estudos já foram realizados com extratos, frações e substâncias isoladas de plantas, obtendo resultados promissores, principalmente em sistemas *in vitro* (Rocha *et al*, 2005, Sen e Chattergee, 2011, Singh *et al*, 2014) mas ainda nenhuma terapia baseada em produtos naturais é empregada no tratamento da LT preconizada pelas agências de saúde dos países onde a leishmaniose é endêmica.

Este fato pode ser atribuído a uma série de fatores, que perpassam por questões políticas, sociais e econômicas e que não serão aqui discutidas, mas também há a questão que os trabalhos que continuam os estudos frente a leishmaniose para modelos *in vivo* são mais escassos, principalmente os trabalhos voltados para a utilização de produtos naturais. Há uma tendência na busca de princípios ativos na sua forma purificada a ser avaliada contra espécies causadoras da leishmaniose, porém as quantidades obtidas destas substâncias isoladas geralmente é diminuta, sendo este um fator limitante para a continuidade dos estudos.

Esta tendência é muitas vezes estimulada pela maior facilidade de compreender os mecanismos inibitórios de uma droga na sua forma purificada ao invés de em formas de misturas, ponto muitas vezes essencial para publicações científicas de maior impacto. Mas a questão da complexidade das interações entre as substâncias presentes em extratos e frações não-purificadas, sua ação sinérgica tanto no metabolismo do parasita quanto no do

hospedeiro é uma característica que deve ser considerada quando busca-se o tratamento de uma doença como a leishmaniose (Sen e Chatterjee, 2011).

Por outro lado, a biodiversidade que ocorre no Brasil deve ser considerada para a obtenção de matéria-prima vegetal com potencial biológico. Este trabalho buscou avaliar a atividade presente em diferentes extratos de uma planta nativa brasileira, *Libidibia ferrea*, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro. A primeira etapa foi triar extratos com diferentes polaridades e diferentes partes da planta a fim de identificar se havia e qual seria o extrato promissor para futuros estudos. Dos seis extratos obtidos, o extrato metanólico do epicarpo mostrou-se o único com atividade prolongada, observada nos ensaios *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, corroborando com estudos anteriores realizados pelo grupo do Laboratório de Leishmaniose do INPA (Cortez, 2004; Falcão, 2010).

Estudos químicos mostraram que este extrato também apresentou altas concentrações de fenólicos e flavonoides, classes de metabólitos já amplamente descritos e isolados do gênero *Libidibia* ou *Caesalpinia* (Nakamura *et al*, 2002, Srinivas *et al*, 2003, Nozaki *et al*, 2007, Shu *et al*, 2011). Diferentes estruturas de metabólitos da classe de fenólicos já mostraram interação na topoisomerase II de espécies de *Leishmania* (Sen e Chatterjee, 2011), sendo este um possível mecanismo de ação inibitória o qual foi observado.

Quando frações obtidas do extrato metanólico do epicarpo foram avaliadas em sistemas *in vitro*, uma fração mais lipofílica, a Fr2-DCM mostrou-se com potencial superior a todas as demais, e com comportamento inibitório similar ao extrato, inibindo em tempo prolongado quando em contato com as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. As análises químicas mostram também a presença de fenólicos e possivelmente do triterpeno ácido betulínico. Porém, os valores obtidos experimentalmente da concentração efetiva (EC<sub>50</sub>) da quercetina isolada e do ácido betulínico relatado na

literatura (Dominguez-Carmona *et al* 2010) são superiores aos valores determinados para a fração neste trabalho, mostrando que a ação conjunta pode ter maior potencial que dos compostos isolados.

Outra questão de relevância para o tratamento da leishmaniose cutânea é a via de administração da terapia a ser utilizada, que por sua forma clínica localizada na pele, vem despertando o interesse em tratamentos por formulações tópicas. Muitos estudos concentram-se em formulações contendo a paromomicina como fármaco (El-On *et al*, 2007, Bavarsad *et al.*, 2012), e até o momento são escassos relatos de pentamidina como uso tópico, apesar de ser um fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose. Resultados preliminares determinaram neste trabalho uma formulação do tipo emulsão não-iônica que possivelmente pode ser utilizada para incorporar a pentamidina, mas a continuidade de estudos com estas emulsões ainda são necessárias para determinar sua eficácia.

Os resultados com a pentamidina serviram de base para a preparação e análises com emulsões contendo o extrato metanólico de *L. ferrea*, os quais não mostraram eficácia na eliminação ou controle da presença do parasita em concentrações relativamente baixas (2,5%) quando avaliados na leishmaniose experimental em modelo animal. Este resultado pode ser atribuído a vários fatores, como incompatibilidade com os excipientes e o extrato, concentração inferior a dose efetiva, e até quanto ao tempo de tratamento.

Os conhecimentos resultantes deste trabalho podem servir como base para futuros estudos que visem a produção de fitoterápicos a partir de *L. ferrea* como uma terapêutica alternativa para a leishmaniose cutânea, uma importante doença negligenciada no Brasil e no Mundo. O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico poderia ser obtido com custo muito menor, quando comparado às altíssimas quantias envolvidas no desenvolvimento de fármacos sintéticos (Oliveira, Gilbert, Villas-Boas, 2013).

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados e as discussões abordadas neste trabalho permitem a conclusão dos seguintes pontos:

- ✓ O extrato metanólico do epicarpo (EpMeOH) obtido de *Libidibia ferrea* é o mais promissor, pois possui atividade *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* e não apresenta citotoxicidade em macrófagos J774.
- ✓ O extrato EpMeOH é obtido com altos valores de rendimento do material vegetal, além de possuir os maiores valores de fenólicos entre os extratos e altas concentrações de flavonoides.
- ✓ A fração DCM apresenta potencial *in vitro* anti-leishmania contra *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* superior ao extrato EpMeOH e também não mostra atividade citotóxica em macrófagos J774.
- ✓ A fração DCM é uma mistura de fenólicos e terpenoides e cinco substâncias podem ser visualizadas por métodos cromatográficos.
- ✓ Emulsões de uso tópico contendo pentamidina podem mostrar potencial terapêutico, mas tempo de exposição prolongado parece ser necessário.
- ✓ Emulsões de uso tópico são eficientes em controlar a concentração de parasitas, mas parecem não atuar na resposta inflamatória e evolução clínica das lesões em animais experimentais susceptíveis como hamsters infectados.
- ✓ Formulações tópicas hidrofílicas, como hidrogéis, são promissoras no tratamento da leishmaniose cutânea, controlando a concentração de parasita e atividade inflamatória

## 7. PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu determinar novos alvos farmacológicos potenciais para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar, mas ainda são necessário estudos para compreender vários aspectos com este tratamento e o prosseguimento destes deve considerar:

- ✓ Estudo da permeação cutânea dos tratamentos de uso tópico, em modelo *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ Etapas experimentais pré-clínicas com outros modelos animais susceptíveis ou pouco susceptíveis, tais como camundongos BALB/c, C57Black, e até mesmo em primatas;
- ✓ Concentrar estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, como DSC;
- ✓ Compreender aspectos farmacológicos do tratamento tópico promissor, assim como suas características toxicológicas;
- ✓ Estudos químicos dos extratos/frações ativas de diferentes matrizes, visando o controle de qualidade do material vegetal e sua homogeneidade de atividade biológica;
- ✓ Conhecer mecanismos celulares, como a produção de iNOS e outras espécies reativas de oxigênio quando na presença de extratos e fração ativas.
- ✓ Avaliar o uso tópico em animais inoculados com diferentes espécies de *Leishmania*, a fim de minimizar a ineficácia devido a características que envolvem a espécie do patógeno.

## 8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. Preclinical and clinical studies of Lapachol and Beta-lapachone. **The Open Natural Products Journal**. v. 2, p. 42-47. 2009.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. V.7, n.5, Epub May 31. 2012.

APONTE JC, CASTILHO D., ESTEVEZ Y, GONZALEZ, G, GERALD JA, HAMMONDA MS. In vitro and in vivo anti-Leishmania activity of polysubstituted synthetic Chalcones. **Bioorg & Med Chem Lett** v. 20, p. 100–103. 2010.

ARMIJOS, R.X. M. M. WEIGEL , M. CALVOPÍÑA M.MANCHENO, R.RODRIGUEZ. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**. V.91, p. 153-160. 2004.

ASHFORD R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Derm** 14: 523-532, 1996.

AZEREDO-COUTINHO RB, MENDONÇA SC, CALLAHAN H, PORTAL AC, MAX G. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (Glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. **J Parasitol** v. 93, p. 688-693. 2007.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**. v. 55, p. 589-595. 2000.

BARREIRO, E. & BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 679-688, 2009.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M.A.; LAWRENCE, F.; ROBERT GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant Leishmania. **Exp. Parasitol.** v. 85, p. 274 – 82, 1997.

BATES, PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol.** Aug. v.37, n. 10, p. 1097-106. Epub Apr 18. 2007.

BATUBARA, I.; MITSUNAGA, T.; OHASHI, H. Brazilian from Caesalpinia sappan wood as an antiacne agent. **The Japan Wood Research Society**, v.56, pp. 77–81, 2009.

BAVARSAAD, N. B. SEDIGHEH F. BAZZAZ, A. KHAMESIPOUR, M. R. JAAFARI Colloidal, in vitro and in vivo anti-leishmanial properties of transfersomes containing paromomycin sulfate in susceptible BALB/c mice. **Acta tropica**, v. 124, p. 33-41. 2012.

BERMAN, J.D.; HANSON, W.L.; CHAPMAN, W.L.; ALVING, C.R.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 30, p. 847-51, 1986.

BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.** V. 10, p. 560–586. 1988.

BERMAN, J. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect Dis.** v. 24, p. 684-703, 1997.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Clin. Infect Dis.** v. 7 p. 33 – 38. 2005

BLACKWELL, J. M. et al. SLC11A1 (formerly NRAMPI) and disease resistance. **Cell. Microbiol.** v. 3, p. 773–784. 2001.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BUSSET, A.D.; COX, B.; WAIGH, R.D. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. **In: Drug Discovery**. p. 847-900. 2003.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; FILHO, D.S.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, L. P., PASSOS, S., DUTRA, W.O., SOTO, M.; ALONSO, C., GOLLOB, K.J., CARVALHO, E.M., RIBEIRO DE JESUS, A. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. **Scand J Immunol**, v. 61, n. 4 p. 337-422, 2005.

CARVALHO, N. D. Distribuição espacial dos agentes etiológicos da LTA no Amazonas por meio de técnicas de geoprocessamento a partir de dados catalogados e analisados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Relatório Final (Iniciação Científica) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, 2011.

CARVALHO, S. et al. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. **Acta Trop.** v. 109, 131–135. 2009.

CASTRO, E.A.; SOCCOL, V.T.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 445-452, 2002.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS, D.F.; FERNANDES, G.S.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.

CHARRET, K. S. et al. The histopathological and immunological pattern of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives. **Experimental Parasitology**. V. 133. P. 201-210. 2013.

CORTEZ, A. C. Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Libidibiaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp. Dissertação. Mestrado em Patologia Tropical. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

COSTA, L, M, J. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta médica da Bahia**, Salvador, 2005.

CUNHA, A.P.; UCHÔA, A.F.J.; ALMEIDA, R.R.; RIBEIRO, A.C. B.; BRITO, D.H.A.; VIEIRA, I.G.P.; GOMES, E.C.C.; RICARDO, N.M.P.S.; RICARDO, N.M.P.S. Desenvolvimento de membranas de alginato e pectina associadas a bioativos vegetais para tratamento em queimaduras. **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, 2012.

DA SILVA, L.C.N.; JÚNIOR, C.A.S.; DE SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; DA SILVA, M.V.; Correia, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1-7, 2011.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p.

DOMINGUEZ-CARMONA, D.B. et al. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. **Phytomedicine**, v. 17, p. 379-382. 2010.

EISSA, M.M.; AMER, E.I.; El SAWY, S.M.F. Leishmania major: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 382–390, 2011.

EL-ON, J.; CAWICH, F.; EVANS, D.A.; WEINRAUCH, L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis in belize: *in vitro* and *in vivo* studies with *leishmania mexicana*. **International Journal/or Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 121-127, 1993.

EL-ON, J.;LIVSHIN, R.; EVEN-PAZ; HAMBURGER, D. WEINRAUCH, L. Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **J of Investigative Dermatology** v. 87, p. 284–288. 1986.

EL-ON, J.; CAWICH, F.; EVANS, D.A.; WEINRAUCH, L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis in Belize: *in vitro* and *in vivo* studies with *Leishmania mexicana*.**Int J ofParasitol**, v. 23, n. 1, p.121-127, 1993.

FALCÃO, N. M. S. **Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Libidibia ferrea* Martius (Fabales: Libidibiaceae)**. Dissertação – Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Amazônia, Manaus, 2010.

FOLLADOR, I.; ARAÚJO, C.; CARDOSO, M. A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E. M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n.5, p. 497-503, 1999.

FRASSON, A.P.Z.; BITTENCOURT, C.F.; HEINSMANN, B.M. caracterização físico-química e biológica do caule de caelsepinia ferrea mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n. 1, p. 35-39, 2003.

FRÉZARD F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.

FUMAROLA L, SPINELLI R, BRANDONISIO O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res in Microbiol** v. 155: 244-230. 2004

GARNIER, T. CROFT, SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opinion Investig Drugs**, v. 3. 2002.

GANESAN, A. Recent developments in combinatorial organic synthesis. **Drug Discov Today**. v. 1, p. 47-55, 2002.

GASSER, J.R.R.A.; MAGILL, A.J.; OSTER, N., FRANKE, E.D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.** v. 18, p. 83-90.1994.

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

GIORGIO, S.; BARÃO, S.C. Intracellular *leishmania amazonenses* killing induced by the guanine nucleoside 8-bromoguanosine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 40, n. 4, 1998.

GONCALVES, G. S. A. P. FERNANDES, R. C. CARVALHO, SOUZA, J. E. CARDOSO, F. DE OLIVEIRA-SILVA, F. C. MACIELB, A. RABELLO, L. A. M. FERREIRA, Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania*

*(Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta tropica**. V. 93, p. 161-167. 2005.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H., LINDOSO, J. Current Diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Anti. Infect. Ther**, v. 8 (4) p. 419 -433. 2010.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. In: **Drug Discovery from Nature**. Berlin: Springer; p. 3-37, 2000.

GRECCO, S.S.; REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R.L.O.R.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M.J.P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Experimental Parasitology**. V. 130, p. 141–145, 2012.

GRIMALDI JR., G.; TESH, R. B. & MCMAHON-PRATT, D., A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 41:687-725, 1989.

GUIZANI, M. MUKHTAR, J. ALVAR, S. Ben ABDERRAZAK, J. SHAW. Leishmaniasis. **Encyclopedia of Environmental Health**. p. 453-480. 2011.

IESUS. **Informe Epidemiológico do SUS/ Centro Nacional de Epidemiologia**. Coord. – Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1999.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2nd ed. Massachussets: Sinauer Associates, 1999. 576 p.

JULIANO, V.N.M. **Modulação da Toxicidade de Injetáveis de antimoniato de Meglumina através do estudo de desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.** Dissertação – Mestrado em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004. 72p.

KAYE, P. SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature**, v. 9, p. 604-605. 2011.

KOOP, H.S. Hidrogéis binários de Xantana e Galactomana com incorporação de curcumina visando uso tópico. Tese. Doutorado em Biquímica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: Paraná. 2012.

KRAUSE, G. e KROEGER, A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**, v. 88, 92-94. 1994.

LALA, S.; GUPTA, S.; SAHU, N. P.; MANDAL, D.; MONDAL, N. B.; MOULIK, S. P.; BASU, M. K. Critical evaluation of the therapeutic potential of basic acid incorporated in oil-in-water microemulsions and poly-d,l-lactide nanoparticles against experimental leishmaniasis. **Journal of Drug Target**, v.14, n.4, p. 171-179, 2006.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 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., eds. **Biology of the Kinetoplastida**. New York, Academic Press. 1-116, 1979

LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In : Peters W, Killick-Kendrick R (eds) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Academic Press, London, volume 1, p. 1987.

LARBI, E.B. AL-KHAWAJAHA, A.AL-GINDAN, Y.JAIN, S.ABAHUSAIN, A.;AL-ZAYER, A.A randomized double-blind clinical trail of topical clotrimazole versus miconazole for treatment of cutaneous leishmaniasis in the eastern province of Saudi Arabia.**Am J Trop MedHyg.**,v. 52, p. 166–168. 1995.

LEPROHON P, FERNANDEZ-PRADA C, GAZANION E, MONTE-NETO R, OUELLETTE M. Drug resistance analysis by next generation sequencing in **Leishmania**. **Int J Parasitol: Drugs and Drug Resist** v. 5, p. 26–35. 2015.

LEWIS, G.P. Tribe Caesalpinieae. In: Lewis, G., Schrire, B.,Mackinder, B., Lock, M. (Eds.), **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK, pp. 127–159, 2005.

LIMA, J.P.S.; PINHEIRO, M.L.B.; SANTOS, A.M.G.; PEREIRA, J.L.S.; SANTOS, D.M.F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E.V. *In Vitro* Atilishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Rev. Virtual Quim.** V.4, n. 6, p. 692-702, 2012.

LIMA, A.C.V.M.R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil**. Dissertação- Doutorado em Ciências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. 166p.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001

LIMA EB, PORTO C, MOTTA JCO, SAMPAIO RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An. Bras. Dermatol.* 2007;82:111-24.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 384 p.

MAEKELT, G. A. **Immune response to intracellular parasites**. I. *Leishmania*. In E. J. L. Soulsby (ed.), *Immunity animal parasites* Academic Press Inc., London. , p. 343-363, 1972.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KFB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Publ** v.10, p. 59-375, 1994.

MIRANDA-VERASTEGUI C, LLANOS-CUENTAS A, AREVALO I, WATD BJ, MATLASHEWSKI G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin Infect Dis** v. 40, p. 1395–403. 2005.

MOREL CM. 1984. **Genes and antigens of parasites: a laboratory manual** (2nd edn). Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro RJ.

MORENO E., SCHWARTZ J., LARREA E., CONDE IE, F., S. CARMEN, I. J. MANUEL, ESPUELAS S., Assesment of  $\beta$ - lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2015.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. **Química Orgânica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1996.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Seminar**. v. 77, p. 366-1561, 2005.

NAGELREITER C., A, E. KRATOCHVILOVA A, C. VALENTA Dilution of semi-solid creams: Influence of various production parameters on rheological properties and skin penetration. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 478, p. 429-438. 2015.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M., TOKUDA, H.; NISHINO, H.; JUNIOR, F.P. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**. v. 177, p. 119–124, 2002.

NEVES, L. O.; GADELHA, E. P. N.; GUERRA, J. A. O.; TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; SILVA-JUNIOR, R. M.; FERREIRA, L. C. M. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento de leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**. V. 86, n.6, p.1092-101, 2011;

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M, SNADER, M.K. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep**. v.17, p.215-34, 2000.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; AKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMAE, M.; AKAO, Y. Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**. v. 48, p. 8290–8292, 2007.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, 2005.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu. v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, L.F. GILBERT, B. VILLAS-BOAS, G. K. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. **Revista Fitos**, v. 8 (1), p. 1-72. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE: Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos. Brasília – DF, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Controlo f Leishmaniasis. Geneva, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2012. <  
[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en)> Acesso 26/02/14.

PACE. D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**. V. 69, p. 10-18. 2014.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis N° 1, 2013.

PAIVA, B.R.; SECUNDINO, N.F.C., PIMENTA, P.F.P.. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n.1 2007.

PECK, C.C.; BARR, W.H.; BENET, L. Z.; COLLINS, J., DESJARDINS, R. E; FURST, D. E. Opportunities for Integration of of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development. **Pharm Res**. v.9, p. 826-33,1992.

PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L.; CODONHO, B. S.; BARBIERI, C. L.; BEIJO, L. A.; DORIGHETTO, A. C.; D’MARTIN, E. C.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.

PEREIRA LP, SILVA RO, BRINGEL PHSF, SILVA KES, ASSREUY AMS, Pereira MG. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **J Ethnopharmacol** v. 139, p. 642–648. 2012

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismo imunológicos, tratamento e profilaxia. **Informa**, v. 16, n. 7-8, 2004.

PINHEIRO, F. G.; LUZ, L. S. B.; FRANCO, A. M. R.. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 38, p.165-172, 2008

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the Leguminosae. **In Advances in Legume Systematics**, v. 1, p.1-25, 1981.

PORTAL DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE  
[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31917](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31917)  
Acesso: 26/02/13.

FVS. PORTAL DA SAÚDE. SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2013a [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta\\_casos08\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf).  
Acesso em 12/02/13.

BRASIL, PORTAL DA SAÚDE. SISTEMA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2013b.  
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>.  
Acesso: 26/02/13.

PORT'S, P.S.; CHISTE, R.C., GODOY, H.T., PRADO, M.A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Res. Int.** v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013

POINAR, G.J. Early cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz** v.102, p. 635-7. 2007.

RAMALHO-ORTIGÃO, M., SARAIVA EM, TRAUB-CSEKO YM. Sand Fly-Leishmania interactions: long relationship are not necessarily easy. **The open Parasitology journal** v. 4, p. 195-204. 2010.

RAMIREZ JR, ADUGELO S, MUSKUS C. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitological diagnosis. **J Clin Microbiol** v. 38, p. 3768–73. 2000

RAVICHANDRAN, K. S. & LORENZ, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nature Rev. Immunol.** v. 7, p. 964–974. 2007

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da Arte. **Quim. Nova**, v. 26: 4, p. 550-555. 2003.

REITHINGER, R. JEAN-CLAUDE D., HECHMI L., C. PIRMEZ, B. ALEXANDER, S. BROOKER. Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** V. 7, p. 581-597. 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACEDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514–535, 2005.

RODRÍGUEZ, A.M.; CAMARGO, J.R.; GARCÍA, F.J.B. Actividad *in vitro* de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 350-355. 2008.

ROSSI-BERGMANN, B.; FALCÃO, C. A. B.; ZANCHETTA, B.; BENTLEY, M. V. L. B.; SANTANA, M. H. A, Performance of Elastic Liposomes for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Nanocosmetics and Nanomedicine**. p. 181-196. 2011.

RUIZ, H.K. et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 473, p. 148-157. 2014.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, p. 289–294. 2009.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **J Ethnopharmacol**. v. 120, n. 2, p. 204-8. 2008.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541 – 1543. 2010.

SILVEIRA, F.T.; MORAES, M.A.P.; LAISON,R.; SHAW, J.J. Leishmaniose Cutânea Experimental. III – Aspectos Histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (Priates: Cebidae) por *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 32, n. 6, p. 387-394. 1990.

SIMÕES. C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. 821 p.

SINAGRA, a.; LUNA, C.; ABRAHAM, D.; IANNELLA, M.C.; RIARTE, A.; KROLEWIECKI, A.J. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia)*

*braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 6, p. 627-630. 2007.

SCHRIEFER, A., SCHRIEFER, A. L. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 72, n.1, p. 508-514. 2004

SEN R., CHATTERJEE M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine** v. 18, p. 1056– 1069. 2011

SILVA LCN, SILVA-JUNIOR CA, SOUZA RM, MACEDO AJ, SILVA MV, CORREIA MTS. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food Chem Toxicol** v. 49: 2222–2228. 2011.

SILVEIRA, F.S. LAINSON, R. CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99 (3), p. 239-251. 2004

SNEADER, W. Drug Prototypes and their Exploitation. **Chichester: Wiley**, 1996.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, p. 139 – 140. 2004.

SCHWARTZ, J. et al. Topical treatment of *L. major* infected BALB/c mice with a novel diselenide chitosan hydrogel formulation. **European Journal of Pharmaceutical Science**. V. 62, p. 309 - 316. 2014

SOTO, J.; TOEDO, P.; GUTIERREZ, J.; NICHOLLS, J.; PADILLA, J.; ENGEL, C.; FISCHER, A.; VOOS,; BERMAN, J. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 57–61, 2001

SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. Nova Odessa: Plantarum. 2012.

TALHARI, S.; ARIAS, J.A.; CUNHA, M.G.S.; NAIFF, R.B. NAIFF, M.F.; FREITAS, R.A.; BARRETT, T. Leishmaniose no Estado do Amazonas - Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, n. 6, p. 433-438. 1988.

TANAKA, J.C.A.; DA SILVA, C.C.; FERREIRA, I.C.P.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; DE OLIVEIRA, A.J.B. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**. v. 14, p. 377-380, 2007.

TANAKA, E. M.; RIBEIRO, M. G.; MEGID, J.; LISTONI, F.J.P. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54 (3). 2005.

TEIXEIRA, A. C.; PAES, M. G.; GUERRA, J. O.; PRATA, A.; VERGARA, M. L. Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 49 (4), 2007

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 15, p. 525 -32, 2011.

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**. v. 43, n. 5, p. 1234, 1999.

TRACY, J.B.; WEBSTER-JUNIOR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and

other protozoal infection. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Pergamon-Press, New York; 1996.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S.M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**. v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

VIEIRA, M.L. et al. Casos de leishmanioses em pacientes atendidos nos centros de saúde e hospitais de Jacobina-BA no período de 2000 a 2004. **Rev. Baiana de Saúde Pública**, v. 31, n. 1, p. 102-114, 2007.

VIRENDRA, K.D.; VERMA, G., AGARWAL, D.D.; KAISER, M., NAD BRUN, R. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya, India. **Journal of Ethnobotany**, v.136, n.1, p. 123-28, 2011

ZANCHETTA, B. Sistema nanoestruturado liposomal contend Chalcona CH8 para o tratamento da Leishmaniose Cutânea. Dissertação. Mestrado em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas: São Paulo, 2009.

ZIEGLER, H. L. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure–activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 12 , p. 119–127. 2004.

## 9. ANEXOS



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

### PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

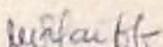
Número do Protocolo: 009/2012	Data de Entrada: 04/04/2012
Pesquisador Responsável: CLÁUDIA DANTAS COMANDOLLI WYREPKOWSKI	
Título do Projeto: "Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Leishmania férrea</i> Martius e estudo de uma formulação para o tratamento de Leishmaniose Tegumentar"	
Instituição Responsável: INPA	

### RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 12.11.2012

Atenciosamente,

  
Dra. Maricleide Naiff  
Vice-Presidente da CEUA-INPA