

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Annona mucosa*, *Annona sericea* E *Ephedranthus amazonicus* FRENTE A *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* E *L. guyanensis*

JANAINA PAOLUCCI SALES DE LIMA

MANAUS
2012

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

JANAINA PAOLUCCI SALES DE LIMA

AValiação DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Annona mucosa*, *Annona sericea* E *Ephedranthus amazonicus* FRENTE A *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* E *L. guyanensis*

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM)
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Izaltina Silva Jardim Cavalli (IPEPATRO)

MANAUS
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

L732a Lima, Janaina Paolucci Sales de

Avaliação da atividade leishmanicida de *Annona mucosa*, *Annona sericea* e *Ephedranthus amazonicus* frente a *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* / Janaina Paolucci Sales de Lima. - Manaus, AM : UFAM, 2012.

184 f. : il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Tese (Doutor em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Lúcia Belém Pinheiro. Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª Izaltina Silva Jardim Cavalli.

1. Anonácea – Uso terapêutico 2. Leishmaniose – Tratamento 3. Biotecnologia 4. Ervas – Uso terapêutico 5. Plantas medicinais I. Pinheiro, Maria Lúcia Belém (Orient.) II. Cavalli, Izaltina Silva (Co-orient.) III. Título

CDU (2007): 582.677.5:616.993.161(043.3)

JANAINA PAOLUCCI SALES DE LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Annona mucosa*, *Annona sericea* E *Ephedranthus amazonicus* FRENTE A *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* E *L. guyanensis*

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 12 de julho de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maria Lúcia Belém Pinheiro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a Izaltina Silva Jardim Cavalli
Universidade de São Paulo

Prof^a Dr^a Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a Maria da Paz
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^a Dr^a Sonia Rolim Reis
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Ao meu marido Jorge Fernandes de Lima Neto,

pelo amor, apoio, incentivo e

compreensão nos momentos de ausência.

OFEREÇO

Aos meus pais José Edmilson de Melo Sales e Maria Auxiliadora Paolucci Sales

Aos meus filhos Gabriel Paolucci Sales Frota Corrêa e Edmilson Paolucci Sales de Lima

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que me levou em seus braços quando não pude andar.

Aos meus pais, José Edmilson de Melo Sales e Maria Auxiliadora Paolucci Sales, vocês sempre foram meu amparo nos momentos difíceis, sou eternamente grata por tudo.

Ao meu marido, Jorge Fernandes de Lima Neto obrigada por ser o esteio de nossa família, por me acalmar e me silenciar quando necessário.

Aos meus filhos, Gabriel Paolucci Sales Frota Corrêa e Edmilson Paolucci Sales de Lima agradeço pelos sorrisos e choros, que sinalizavam os momentos de retorno para família.

A minha irmã, Carla Paolucci Sales agradeço pelos desabafos, incentivos e conselhos à melhoria desse trabalho.

Aos meus sogros Anastácio Barreto de Paula e Maria Eunice Lima de Paula agradeço pela convivência agradável, por todo apoio e auxílio oferecidos em Manaus – AM.

A minha sobrinha, Helena Carolina Alves Barreto agradeço pela dedicação e por sua presença em nossas vidas.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biotecnologia agradeço pelos conhecimentos técnicos-científicos.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários do IPEPATRO agradeço pelo apoio dispensado para a realização desse trabalho em Porto Velho – RO.

Aos docentes Antônio Marcos Guimarães dos Santos, Danielle Cardoso de Alencar, Delvânia Marta Ferreira Santos, José Lamak da Silva Pereira que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, obrigada pela dedicação.

Aos casais Janeide Lima Alecrim e Alexandre Mascarenhas Alecrim; Thelma Cristina Sant'Anna Ferreira e Wanderlei Mendes Ferreira agradeço pelo convívio, pela amizade e a cima de tudo pelos momentos de descontrações regadas a café.

A FAPEAM pelo financiamento e auxílios concedidos para realização desse trabalho.

À Dr^a Maricleide de Farias Naif, do INPA, pelo generoso apoio no fornecimento das Cepas de *Leishmania* spp.

As professoras Dr^a Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreir (UFAM), Dr^a Leonor Alves de Oliveira da Silva (UFAM) e Dr^a Maria da Paz (INPA), membros da banca de qualificação pelas sugestões e comentários oportunos, meus sinceros agradecimentos.

As professoras Dr^a Maria Lúcia Belém Pinheiro, Dr^a Izaltina Silva Jardim Cavalli, Dr^a Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreir (UFAM), Dr^a Maria da Paz (INPA) e Dr^a Sonia Rolim Reis (INPA), membros da banca julgadora da tese pela avaliação, por suas sugestões e pelo apuro nas correções enriquecendo o trabalho final, meus sinceros agradecimentos.

A minha co-orientadora, Dr^a Izaltina Silva Jardim Cavalli, agradeço pela co-orientação, convivência e apoio que proporcionaram a realização desse trabalho.

A minha orientadora, Dr^a Maria Lúcia Belém Pinheiro, agradeço pela orientação, oportunidade e confiança que contribuíram para minha formação profissional.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Constitui um crescente problema de saúde pública e é considerada uma das endemias de interesse prioritário. Tendo em vista dificuldades de aplicação e toxicidade encontradas em tratamentos com as drogas disponíveis no mercado, um grande número de espécies botânicas é investigado como fontes alternativas de substâncias antileishmania. Neste contexto a família Annonaceae possui destaque, várias espécies apresentam moléculas potencialmente bioativas. Assim, as espécies *Annona mucosa*, *Annona sericea* e *Ephedranthus amazonicus* foram avaliadas em culturas de promastigotas de *Leishmania* spp *in vitro*. Os extratos orgânicos de *A. mucosa* apresentaram atividade frente a *L. amazonensis*, com concentração inibitória de 50% (CI₅₀) entre 9,32 - 46,54 µg/mL; frente a *L. braziliensis*, com CI₅₀ entre 27,42 - 170,15 µg/mL e frente a *L. guyanensis* com CI₅₀ entre 16,23 - 165,02 µg/mL. Os extratos orgânicos de *A. sericea* foram avaliados frente a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sendo observado, CI₅₀ entre 0,40 - 55,86 µg/mL frente a *L. amazonensis* e CI₅₀ entre 86,21 - 151,82 µg/mL frente a *L. braziliensis*. Os extratos orgânicos de *E. amazonicus* foram avaliados frente a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* sendo observado, CI₅₀ entre 2,47 - 2,57 µg/mL frente a *L. amazonensis* e CI₅₀ de 265,45 µg/mL frente a *L. braziliensis*. A partir do extrato em diclorometano das folhas foram isolados e identificados os alcalóides liriodenina (1) e atheroespermidina (2). O alcalóide liriodenina, principal alcalóide isolado deste extrato, apresentou atividade frente a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, sendo

observado respectivamente, CI_{50} de 1,43; 55,92 e 0,84 $\mu\text{g/mL}$. Com base nos resultados apresentados e a perspectiva de maior disponibilidade de cultivo, a espécie *A. mucosa* foi selecionada para avaliação *in vitro* frente a formas amastigotas de *L. amazonensis*. O alcalóide lirioidenina e os extratos orgânicos de *A. mucosa* foram ativos frente a formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, sendo observada redução de 80% de macrófagos infectados e eliminação de 70% de amastigotas intracelulares. O extrato diclorometano e hexânico das folhas de *A. mucosa* foram selecionados para avaliação *in vivo* no tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos BALB/c causada por *L. amazonensis*. As pomadas formuladas a base dos extratos foram eficazes no tratamento da lesão cutânea tanto na aplicação tópica quanto na aplicação intraperitoneal. Os resultados são promissores e estimulam a continuação dos estudos de *A. mucosa* visando à elaboração de um potencial produto leishmanicida.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic infectious disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, widely distributed in tropical and subtropical regions. Constitutes a growing public health problem, and is considered one of the endemic diseases of priority interest. Due to difficulties to application and toxicity found in the treatment with commercial drugs, a great number of botanic species is investigated as alternative sources of antileishmanial substances. In this context the Annonaceae family possesses highlighted several species are potentially bioactive molecules. Then, the species *Annona mucosa*, *Annona sericea* and *Ephedranthus amazonicus* were evaluated *in vitro* in cultures of promastigotes of *Leishmania* spp. The organic extracts of *A. mucosa* showed activity against *L. amazonensis*, with inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) between 9.32 - 46.54 µg.mL⁻¹; against *L. braziliensis*, with IC₅₀ between 27.42 - 170.15 µg.mL⁻¹ and against *L. guyanensis* with IC₅₀ of 16.23 - 165.02 µg.mL⁻¹. The organic extracts of *A. sericea* were tested against *L. amazonensis* and *L. braziliensis* showing, IC₅₀ between 0.40 - 55.86 µg.mL⁻¹ against *L. amazonensis* and IC₅₀ between 86.21 - 151.82 µg.mL⁻¹ against *L. braziliensis*. The organic extracts of *E. amazonicus* were tested against *L. amazonensis* and *L. braziliensis* presenting, IC₅₀ between 2.47 - 2.57 µg.mL⁻¹ against *L. amazonensis* and IC₅₀ of 265.45 µg.mL⁻¹ against *L. braziliensis*. From do dichlorometane leaves extract was isolated two alkaloids identified as liriodenine (1) and atherospermidine (2). The alkaloid liriodenine, major alkaloid isolated from this extract, showed activity against *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis*, being observed, respectively, IC₅₀ of 1.43, 55.92 and 0.84 µg.mL⁻¹. On the basis of

the results obtained and due to better perspective to cultivate, the species *A. mucosa* was selected for evaluation *in vitro* against amastigotes of *L. amazonensis*. The alkaloid liriodenine and organic extracts of *A. mucosa* were active against intracellular amastigotes of *L. amazonensis* observed reduction of 80% of infected macrophages and elimination of 70% of intracellular amastigote. Dichloromethane and hexane extract of leaves of *A. mucosa* were selected for evaluation *in vivo* the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice caused by *L. amazonensis*. The bases of ointments formulated extracts were effective in treating skin injury in both topical application and in intraperitoneally. Results are very promising and stimulate the continuation of the studies on *A. mucosa* to aim for the elaboration of a potential leishmanicidal product.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação taxonômica de <i>Leishmania</i> spp.	28
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	29
Figura 3 - Micrografia da forma promastigota (A) e amastigota (B) de <i>Leishmania</i> spp.	30
Figura 4 - Casos notificados de leishmania tegumentar americana, Brasil 2005.	32
Figura 5 - Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil 2005.	34
Figura 6 - Manifestações clínicas (A) lesão cutânea típica; (B) lesão mucocutânea e (C) lesões cutâneas difusas.	36
Figura 7 - Produção dos intermediários reativos do oxigênio.	41
Figura 8 – (A) Isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). (B) Reação bioquímica de síntese do NO em células de mamíferos.....	43
Figura 9 - Fórmula estrutural de (a) Antimoniato de N-metil-glucamina e (b) Estibogluconato de sódio.	45
Figura 10 - Fórmula estrutural da Anfotericina-B.....	47
Figura 11 - Fórmula estrutural de Isotionato de Pentamidina.	47
Figura 12 - Fórmula estrutural da Miltefosina.	48
Figura 13 - Distribuição mundial das espécies da família Annonaceae.	52
Figura 14 - Fruto de <i>Annona mucosa</i>	54
Figura 15 - Fruto de <i>Annona sericea</i>	55
Figura 16 – Estruturas químicas de alcalóide isolados de folhas de <i>Annona sericea</i>	55
Figura 17 - Folhas de <i>Ephedranthus amazonicus</i>	56
Figura 18 - Estruturas químicas de alcalóides isolados de folhas de <i>Ephedranthus amazonicus</i>	57
Figura 19 - Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas e sementes de <i>Annona mucosa</i>	62
Figura 20 – Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas e galhos finos de <i>Annona sericea</i>	64
Figura 21 - Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas e galhos finos de <i>Ephedranthus amazonicus</i>	64
Figura 22 - Fluxograma da análise cromatográfica e marcha química aplicada ao extrato diclorometânico das folhas de <i>Annona mucosa</i>	66
Figura 23 – Pomadas formuladas a base de extrato diclorometano e hexânico das folhas de <i>Annona mucosa</i>	83
Figura 24 – Distribuição dos grupos experimentais de camundongos BALB/c.....	86
Figura 25 – Medição da lesão cutânea.....	87
Figura 26 – Lesão das patas de camundongos BALB/c duas semanas pós-tratamento.	120
Figura 27 - Estruturas dos alcalóides Líriodenina (1) e Atherospermidina (2).	123

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	90
Gráfico 2 - Atividade leishmanicida de dimetilsulfóxido (DMSO) frente formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do DMSO sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	92
Gráfico 3 - Atividade leishmanicida da pentamidina frente formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito da pentamidina sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	93
Gráfico 4 - Atividade leishmanicida do alcalóide liriodenina (LIRIO) frente formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do LIRIO sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	96
Gráfico 5 - Atividade leishmanicida do extrato diclorometano das folhas (EDF) de <i>Annona mucosa</i> frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do EDF sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	98
Gráfico 6 - Atividade leishmanicida do extrato hexânico das folhas (EHF) de <i>Annona mucosa</i> frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do EHF sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	100
Gráfico 7 - Atividade leishmanicida do extrato metanólico das folhas (EMF) de <i>Annona mucosa</i> frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do EMF sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	101
Gráfico 8 - Atividade leishmanicida do extrato hexânico das sementes (EHS) de <i>Annona mucosa</i> frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do EHS sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	103
Gráfico 9 - Atividade leishmanicida do extrato metanólico das sementes (EMS) de <i>Annona mucosa</i> frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e (C) <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . (D) Efeito do EMS sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c <i>in vitro</i>	104
Gráfico 10 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica das folhas de <i>Annona sericea</i> (FALASF) frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	105
Gráfico 11 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica dos galhos finos de <i>Annona sericea</i> (FALASGF) frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	106

Gráfico 12 - Atividade leishmanicida do extrato hexânico dos galhos finos de <i>Annona sericea</i> (EHGFAS) frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	107
Gráfico 13 - Atividade leishmanicida do extrato metanólico dos galhos finos de <i>Annona sericea</i> (EMGFAS) frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	107
Gráfico 14 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica das folhas de <i>Ephedranthus amazonicus</i> (FALEAF) frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	108
Gráfico 15 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica dos galhos finos de <i>Ephedranthus amazonicus</i> (FALEAGF) frente as formas promastigotas de (A) <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e (B) <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	109
Gráfico 16 - Efeito do alcalóide liriodenina e dos extratos de <i>Annona mucosa</i> na (A) percentagem de macrófagos infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e na (B) carga parasitária (número de amastigotas/macrófagos) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. ...	112
Gráfico 17 - Efeito do alcalóide liriodenina e dos extratos de <i>Annona mucosa</i> na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais.	114
Gráfico 18 - Efeito do alcalóide liriodenina e dos extratos de <i>Annona mucosa</i> na produção de nitrito em macrófagos. (A) macrófagos infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ; (B) macrófagos não infectados.	115
Gráfico 19 – (A) Variação de peso vivo (kg) de camundongos BALB/c nos pré-tratamentos e pós-tratamentos.....	117
Gráfico 20 - Diâmetro da lesão (mm) das patas de camundongos BALB/c nos pré-tratamentos e pós-tratamentos.....	119
Gráfico 21 – Número de promastigotas por pata de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> pós-tratamentos.	121

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Concentração das amostras frente a formas promastigotas.....	71
Quadro 2 - Concentração das amostras na avaliação da viabilidade celular.....	73
Quadro 3 - Concentração das amostras na infecção dos macrófagos.....	76
Tabela 1 – Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais após estímulo com PMA.....	80
Tabela 2 - Produção de óxido nítrico por macrófagos após estímulo com LPS e INF- γ	82
Tabela 3 - Avaliação da atividade leishmanicida em formas promastigotas <i>in vitro</i> dos extratos vegetais e substâncias.....	94
Tabela 4 – Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos vegetais e substâncias.....	95
Tabela 5 - Avaliação do índice de seletividade dos extratos vegetais e da substância isolada frente a <i>L. amazonensis</i>	110
Tabela 6 - Avaliação do índice de seletividade dos extratos vegetais e da substância isolada frente a <i>L. braziliensis</i>	110
Tabela 7 - Avaliação do índice de seletividade dos extratos vegetais e da substância isolada frente a <i>L. guyanensis</i>	110
Tabela 8 - Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (PH8).....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Adenosina trifosfato

BH4 – Tetraidrobiopterina

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

CGEM - Comitê do Patrimônio Genético

CI₅₀ – Concentração Inibitória 50%

CL₅₀ – Concentração Letal de 50%

CO₂ – Dióxido de carbono

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade óptica

EDF – Extrato diclorometânico das folhas de *Annona mucosa*

EHF – Extrato hexânico das folhas de *Annona mucosa*

EHGFAS – Extrato hexânico dos galhos finos de *Annona sericea*

EHS – Extrato hexânico das sementes de *Annona mucosa*

EMF – Extrato metanólico das folhas de *Annona mucosa*

EMGFAS – Extrato metanólico dos galhos finos de *Annona sericea*

EMS – Extrato metanólico das sementes de *Annona mucosa*

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERO – Espécies reativas do Oxigênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FALASF – Fração alcaloídica das folhas de *Annona sericea*

FALASGF – Fração alcaloídica dos galhos finos de *Annona sericea*

FALEAF – Fração alcaloídica das folhas de *Ephedrantus amazonicus*

FALEAGF – Fração alcaloídica dos galhos finos de *Ephedrantus amazonicus*

Fe²⁺ - Íon ferroso

Fe³⁺ - Íon férrico

FeCl₃ - Cloreto férrico
FMN – Flavina mononucleotídeo
GF – galhos finos
GTP - Guanosina trifosfato
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
-HO – Radical hidroxil
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e recursos florestais não renováveis
IL – Interleucina
INF-γ – Interferon gama
iNOS – Óxido nítrico sintase indutível
IPEPATRO/FIOCRUZ – Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais/FIOCRUZ Noroeste
IS – Índice de seletividade
LC - Leishmaniose cutânea
LC/MS – Cromatografia líquida/Espectrometria de Massa
LCD - Leishmaniose cutânea difusa
LIRIO – Alcalóide liriodenina
LMC - Leishmaniose mucocutânea
LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LV – Leishmaniose Visceral
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MS – Ministério da Saúde
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaNO₂ - Nitrito de Sódio
NaOH - Hidróxido de Sódio
NHA: N^G-hidroxi-L-arginina
NK – Células *natural killer*
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NO – Óxido nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
O₂⁻ - Ânion superóxido

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Salina tamponada com fosfato

PENT – Isotionato de pentamidina

PMA – Forbol miristato acetato

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640 Medium (SIGMA)

S – sementes

SD – Desvio padrão

SEM – Erro padrão da média

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema fagocitário mononuclear

sp. – Espécie

spp. – Subespécie

TNF- α – Fosfato de necrose tumoral alfa

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

WHO - World Health Organization

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

µg – Microgramas

µL - Microlitros

µM – Micromolar

cm – Centímetros

g - Grama

h – Hora

kg - Quilogramas

L – Litro

m - Metros

M - Molar

mg - Miligramas

min – Minutos

mL - Mililitros

mm – Milímetros

µm – Micrometros

N – Normal

ng – Nanôgramas

nm – Nanômetros

nM – Nanômolar

p/v – massa por volume

pg – Picogramas

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 LEISHMANIOSE.....	27
3.1.1 CICLO DE VIDA.....	28
3.1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	31
3.1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	37
3.2 FÁRMACOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	45
3.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS PLANTAS	49
3.3.1 ANNONACEAE	51
3.3.1.1 <i>Annona mucosa</i>	52
3.3.1.2 <i>Annona sericea</i>	54
3.3.1.3 <i>Ephedranthus amazonicus</i>	55
3.3.2 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS.....	57
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1 AUTORIZAÇÕES PARA PESQUISA.....	61
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	61
4.2.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E MARCHA QUÍMICA PARA OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES	65
4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS	67
4.3.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> E <i>Leishmania guyanensis</i>	67
4.3.1.1 Parasitas	67
4.3.1.2 Meio de cultura.....	67
4.3.1.3 Cultivo de parasita.....	68
4.3.1.4 Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	69
4.3.1.5 Calibração de controles	69
4.3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> E <i>L. guyanensis</i> APÓS EXPOSIÇÃO ÀS AMOSTRAS	70
4.3.3 OBTENÇÃO, TOXICIDADE E INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS	71
4.3.3.1 Animais.....	71
4.3.3.2 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos	72
4.3.3.3 Teste de viabilidade celular	72
4.3.4 CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA	74

4.3.5	INFECCÃO <i>in vitro</i> DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i>	75
4.3.6	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	77
4.3.6.1	Curva - padrão de peróxido de hidrogênio	78
4.3.6.2	Padronização da dose ótima de acetato forbol miristato (PMA).....	79
4.3.7	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS INFECTADOS	80
4.3.7.1	Curva - padrão de óxido nítrico.....	81
4.3.7.2	Padronização da dose ótima de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (INF- γ) ..	81
4.3.8	AVALIAÇÃO DE LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/c CAUSADAS POR <i>L. amazonensis</i> PRÉ E APÓS TRATAMENTO	83
4.3.8.1	Formulação da pomada.....	83
4.3.8.2	Infecção de camundongos BALB/c com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	84
4.3.8.3	Tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos BALB/c causada por <i>L. amazonensis</i>	84
4.3.8.4	Acompanhamento do peso vivo	86
4.3.8.5	Acompanhamento da lesão cutânea.....	87
4.3.8.6	Quantificação da carga parasitária.....	87
4.3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
5.	RESULTADOS	90
5.1	CURVAS PADRÃO DE CRESCIMENTO.....	90
5.2	CALIBRAÇÃO DE CONTROLES	91
5.3	AÇÃO LEISHMANICIDA NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> spp. E CITOTOXICIDADE.....	94
5.4	EFEITO DO ALCALÓIDE LIRIODENINA E DOS EXTRATOS DE <i>Annona mucosa</i> SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i>	111
5.4.1	EFEITO DO ALCALÓIDE LIRIODENINA E DOS EXTRATOS DE <i>Annona mucosa</i> NA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	113
5.5	BIOENSAIOS <i>IN VIVO</i>	115
5.5.1	EVOLUÇÃO DO PESO VIVO.....	116
5.5.2	DESENVOLVIMENTO E TRATAMENTO DA LESÃO CUTÂNEA.....	118
5.5.3	EXAME PARASITOLÓGICO – LDA	121
5.6	PERFIL FITOQUÍMICO	122
6.	DISCUSSÃO.....	124
7.	CONCLUSÕES.....	137
8.	REFERÊNCIAS	138
9.	APÊNDICES	152
9.1	REVISÃO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA FAMÍLIA ANNONACEAE	152
9.1.1	Extratos e frações da família Annonaceae com atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em formas promastigotas.....	153
9.1.2	Moléculas definidas da família Annonaceae com atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em formas promastigotas.....	161
9.1.3	Extratos e frações da família Annonaceae com atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em formas amastigotas intracelulares.....	165

9.1.4 Moléculas definidas da família Annonaceae com atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em formas amastigotas intracelulares.....	165
9.1.5 Citotoxicidade de extratos e frações da família Annonaceae em células.....	166
9.1.6 Citotoxicidade de moléculas definidas da família Annonaceae em células.....	168
9.2 ATIVIDADE EM FORMAS PROMASTIGOTAS	169
9.2.1 Taxa de inibição de crescimento de formas promastigotas de leishmania <i>in vitro</i>	170
9.3 ATIVIDADE EM FORMAS AMASTIGOTAS	173
9.3.1 Teste de infecção em macrófagos <i>in vitro</i>	174
9.3.2 Produção de nitrito de macrófagos não infectados e infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis in vitro</i>	175
9.3.3 Produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos.....	176
9.4 ATIVIDADE <i>IN VIVO</i>	177
9.4.1 Peso vivo (Kg) de camundongos BALB/c nos pré-tratamentos e pós-tratamentos.	178
9.5 REGISTRO DE COLETA NO IBAMA	181
9.6 CERTIFICADO DO COMITÉ DE ÉTICA (CEUA/IPEPATRO).....	183

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (WHO, 2002; DUJARDIN, 2006).

Os agentes causadores dessa doença são parasitas unicelulares heteroxênicos do gênero *Leishmania* que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. As formas promastigotas caracterizam-se por serem fusiformes e com longo flagelo, são extracelulares e vivem no trato digestório do inseto vetor. As formas amastigotas, por sua vez, são arredondadas e com curto flagelo que não se exterioriza, são intracelulares obrigatórias e parasitam principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado (MICHALICK, 2003).

As perspectivas de controle da doença na região norte são complexas em função da mesma comportar-se como uma zoonose, sendo o homem apenas hospedeiro acidental. Atinge indivíduos que trabalham nas áreas florestais, especialmente envolvidos em atividades de desmatamento, às vezes se comportando como doença ocupacional. Por tratar-se de matas densas de áreas tropicais chuvosas, o conhecimento da biologia e dos hábitos de alimentação das várias espécies de vetores flebotomíneos poderá contribuir para a prevenção da infecção. Outra

possibilidade seria o desenvolvimento de vacinas e a utilização dos cuidados individuais, que é de difícil implementação na prática (ARAÚJO FILHO, 1981; FNS, 2002; MS, 2007).

Assim, a medida profilática considerada ideal seria o desenvolvimento de uma vacina. Embora haja muitos grupos trabalhando na tentativa de desenvolvê-la (CONVIT *et al.*, 2004; TEWARY *et al.*, 2004) ainda há vários fatores que dificultam, tais como os mecanismos efetores da resposta imune no homem, além de obstáculos de ordem política e econômica (HANDMAN, 1997). Devido a essas dificuldades, torna-se importante a busca por novos agentes quimioterápicos. Nesse contexto, uma alternativa bastante promissora é o uso de espécies vegetais, o que na verdade já vem sendo utilizado desde o início da civilização no processo de cura de inúmeras doenças. A isso tudo, acrescenta-se os avanços da medicina que possibilita a comprovação da capacidade de cura de determinadas plantas, o que garante segurança na utilização das mesmas como medicamento (CALIXTO, 2000; ROCHA *et al.*, 2005).

No presente estudo foi avaliada a ação leishmanicida *in vitro* dos extratos de três espécies de Annonaceae em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*; que são as espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) mais ocorrentes na Amazônia brasileira. Com base nos resultados obtidos e a perspectiva de maior disponibilidade para cultivo, a espécie *A. mucosa* foi selecionada para avaliação *in vitro* em amastigotas de *L. amazonensis*. Os extratos promissores foram selecionados para avaliações *in vivo* no tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8).

Pretende-se, com este trabalho, contribuir com subsídios científicos para a formulação de um fitoterápico, ou fármaco, potencialmente eficaz no combate a leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades biológicas de *Annona mucosa*, *A. sericea* e *Ephedranthus amazonicus* encontradas na Amazônia brasileira, frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*; e formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* visando contribuir com subsídios científicos para a formulação de um fitoterápico ou fármaco, potencialmente eficaz, no combate à leishmaniose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* dos extratos brutos, e frações cromatográficas de *A. mucosa*, *A. sericea*, *E. amazonicus* e do alcalóide liriodenina isolado de *A. mucosa* e *A. impressivenia* em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.
- Determinar o efeito citotóxico dos extratos brutos de *A. mucosa* e do alcalóide liriodenina em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

- Avaliar o efeito dos extratos brutos de *A. mucosa* e do alcalóide lirioidenina na infecção e desenvolvimento da *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.
- Avaliar o efeito dos extratos mais promissores de *A. mucosa* no tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos BALB/c causada por *L. amazonensis*.
- Realizar análises cromatográficas e espectrométricas dos extratos mais promissores de *A. mucosa* na atividade leishmanicida *in vivo*, a fim de idênticar as substâncias ativas, puras ou em misturas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (CROFT E COOMBS, 2003). De acordo com as características clínicas e epidemiológicas da doença, as espécies são classificadas em dois sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia* (Figura 1). O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitos digenéticos da ordem kinetoplastida, família Trypanosomatidae (SHAW, 1994). Lainson (1981) demonstrou a dificuldade que os consultores tiveram de incluí-la entre as seis doenças mais importantes do mundo pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (LAINSON & SHAW, 1978).

A contribuição do parasito no polimorfismo clínico das leishmanioses tem sido sugerida e sustentada há anos por estudos que demonstram correlação entre determinados genótipos de espécies e cepas de *Leishmania* e manifestações clínicas da doença (REITHINGER *et al.*, 2007).

Os aspectos das leishmanioses variam ainda conforme região geográfica, provavelmente indicando interação entre propriedades dos parasitos locais, biologia dos vetores presentes na área e fatores da população. Com relação ao papel do hospedeiro, a idade, estado nutricional, eficácia do sistema imune e co-infecções com HIV alteram significativamente as manifestações clínicas da doença (MURRAY *et al.*, 2005).

A evolução da disseminação desta zoonose não se deu de forma similar, daí serem os seus padrões epidemiológicos extremamente diversos a depender da região geográfica e de fatores sócio-culturais da população envolvida. Esta diversidade impossibilita o estabelecimento de padrões epidemiológicos e ecológicos comuns para as diversas regiões, dificultando, assim, a adoção de medidas de controle da doença (ARAÚJO FILHO, 1981; BARRETO *et al.*,1981; COSTA, 1986; DOURADO, 1989).

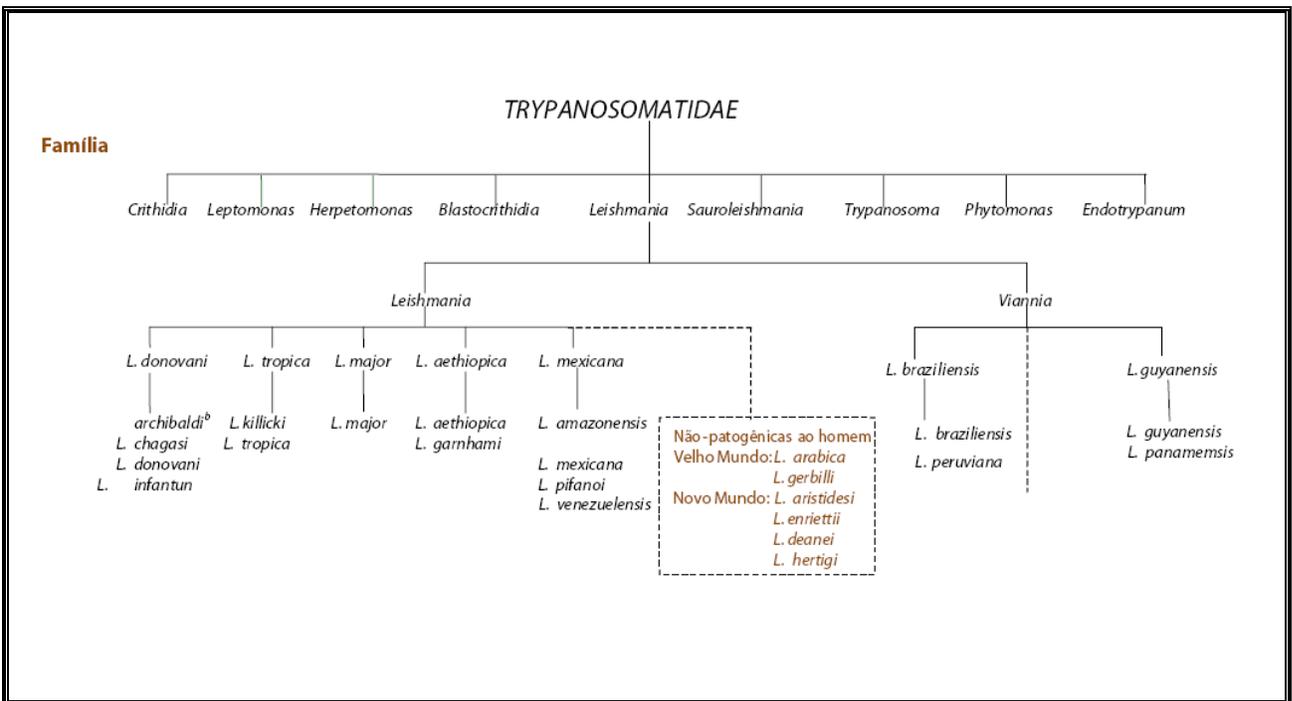


Figura 1 - Classificação taxonômica de *Leishmania* spp.
Fonte: SVS/MS, 2007.

3.1.1 CICLO DE VIDA

Durante seu ciclo de vida (Figura 2), os parasitas circulam entre dois hospedeiros distintos, insetos da ordem Diptera, família Psychodidae (flebotômíneo) e o hospedeiro mamífero. A sobrevivência em organismos tão diversos foi possibilitada pela evolução de formas

parasitárias distintas, adaptadas às diferentes condições de vida encontradas em ambos hospedeiros (HANDMAN, 1999). Os parasitas do gênero *Leishmania* alternam entre duas formas parasitárias: promastigotas, encontradas no trato digestivo do vetor flebotomíneo e as formas amastigotas, as quais são parasitas intracelulares do sistema fagocítico, em tipos celulares como macrófagos (MULLER & BAKER, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2006), células de Langerhans (BLANK *et al.*, 1993), neutrófilos e eosinófilos (GRIMALDI *et al.*, 1984; BEIL *et al.*, 1992).

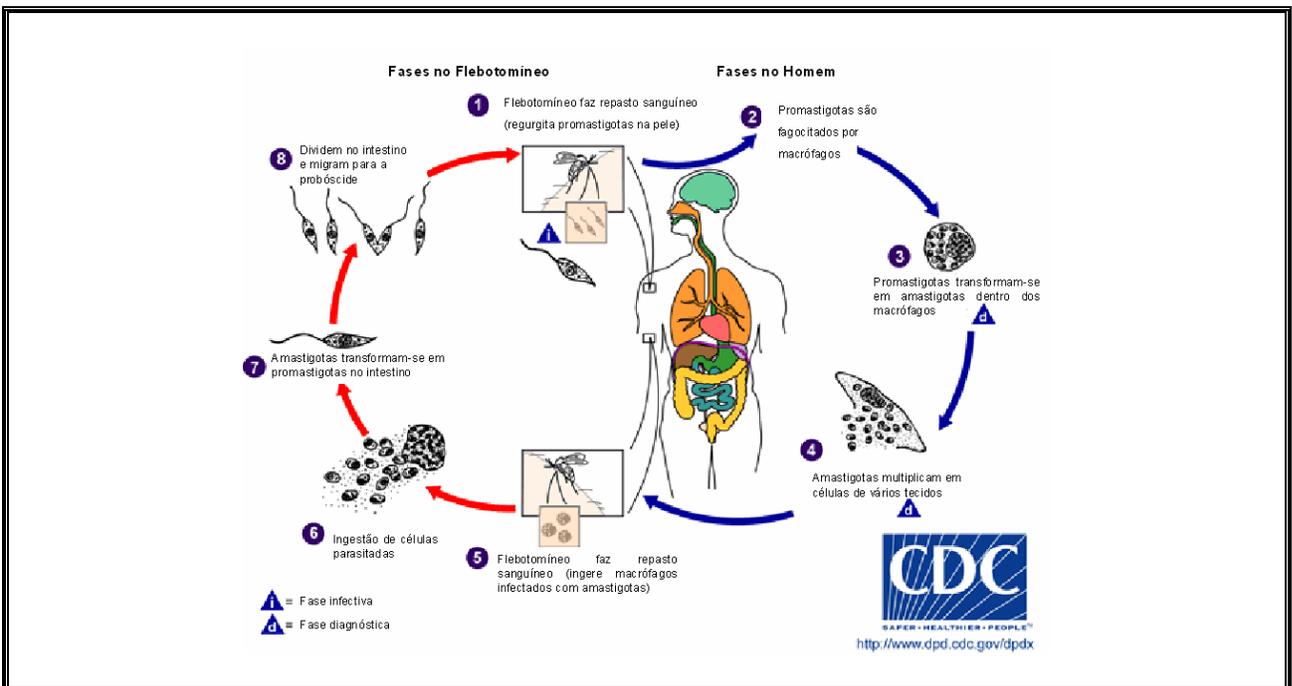


Figura 2 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

O crescimento dos parasitas envolve diferentes estágios no ciclo de vida. Os estágios mais importantes são: amastigota, promastigota pró-cíclica e promastigota metacíclica. O crescimento dos parasitas envolve uma fase log, na qual ocorre uma maior presença de promastigotas pró-cíclicas, uma fase estacionária, com maior concentração de promastigotas metacíclicas e uma fase final de declínio e morte. Promastigotas procíclicas são formas mais alongadas, não

infectivas para o hospedeiro mamífero e que replicam ativamente, sendo predominantes na fase exponencial de crescimento *in vitro*. *In vivo*, procíclicos são encontrados no intestino médio do vetor flebotomíneo, onde se multiplicam e se diferenciam para as formas infectivas metacíclicas. Promastigotas metacíclicos são definidos como formas pequenas, delgadas, com flagelo relativamente longo e que ocorrem em grande número em uma população de fase estacionária *in vitro*. *In vivo*, metacíclicos são encontrados no intestino anterior do flebotomíneo e são infectivos para o hospedeiro mamífero (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1974; CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998; GOSSAGE *et al.*, 2003).

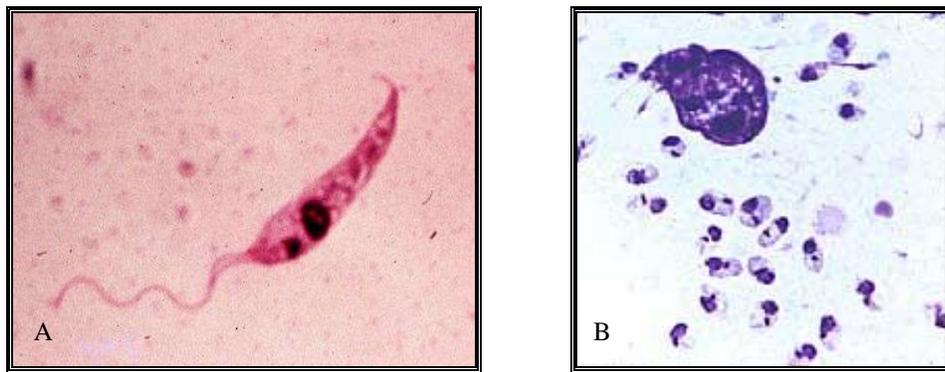


Figura 3 - Micrografia da forma promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* spp.
 Fonte: <http://www.vet.upenn.edu>.

O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 h. Após este período, as fêmeas infectadas ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro mamífero liberam as formas promastigotas metacíclicas (Figura 3A), juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas (Figura 3B) e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a

disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MS, 2007).

3.1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A LTA constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela OMS, como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (WHO, 2002).

As formas clínicas da LTA dependem de fatores do parasito, do vetor e de suas características epidemiológicas, além da constituição genética e imunológica do hospedeiro (REIS *et al.*, 2006). A infecção pode ser assintomática ou apresentar um espectro que varia desde lesões cutâneas localizadas ou disseminadas, forma cutânea - difusa, até graves lesões mucocutâneas (GRIMALDI & TESH, 1993). As manifestações clínicas estão geralmente associadas a uma espécie de *Leishmania*, embora algumas espécies possam causar diferentes formas clínicas (GARCIA *et al.*, 2005).

A LTA apresenta-se no Brasil em fase de expansão geográfica onde já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (MS, 2007).

O diagnóstico é feito pela associação dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (MANSON-BAHR, 1987; KAR, 1995). Infecções parasitárias podem levar a uma

resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4+ e um perfil I de citocinas Th1 ou Th2 (KEMP, 1997; BOGDAN *et al.*, 1990). Paralelamente a essa resposta, a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão do sistema imune do hospedeiro e esse parasito é altamente adaptado ao escape dos efeitos da imunidade humoral e da imunidade celular (SACKS & SHER, 2002; ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002).

A partir da década de 1980 o Ministério da Saúde (MS) verificou um aumento no número de casos registrados de LTA, período em que se solidificaram as ações de vigilância e controle da doença no país, estando distribuída em 19 estados da Federação. De acordo com o MS (2007) no período de 1985 a 2005, verificaram-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes (Figura 4). Entretanto no período de 1988 a 2009, verificaram-se uma média anual de 26.021 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 14,1 casos/100.000 habitantes (MS, 2010).

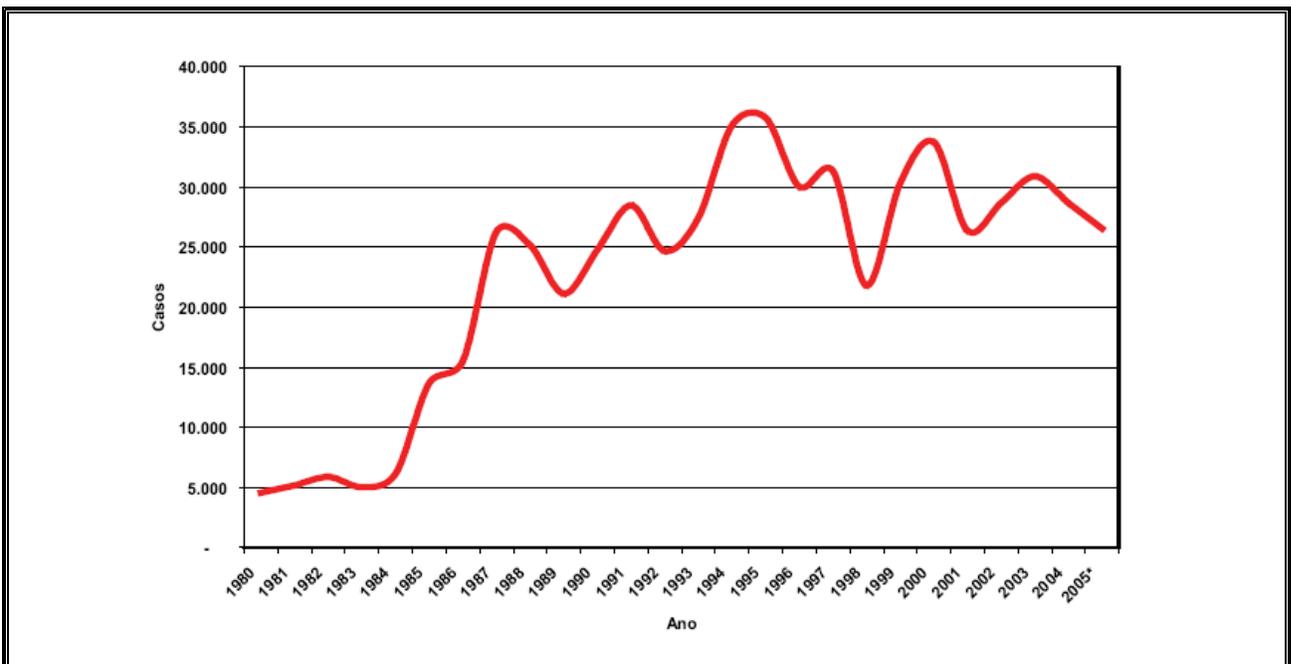


Figura 4 - Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil 2005.

Fonte: SVS/MS, 2007.

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos de LTA têm sugerido mudanças no comportamento da doença. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas, sendo presente em todos os Estados do Brasil. O aumento na incidência de leishmaniose pode estar associado ao desenvolvimento urbano, devastação das florestas, mudanças ambientais e migração de povos para as áreas onde a doença é endêmica (CARVALHO, *et al.*, 2000; PATZ, *et al.*, 2000 e ASHFORD, 2000).

Costa (2005), estudando a epidemiologia das leishmanioses no Brasil, observou que a região Norte destaca-se com 34,9% do total de casos de LTA, com risco de doença de 92,3/100.000 habitantes (cinco vezes a média nacional). A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos da LTA no Brasil, cerca de 37,3% do total de casos registrados no período de 1988 a 2009, e com os coeficientes médios mais elevados de 66,9/100.000 habitantes. As principais espécies mais diretamente envolvidas na LTA no estado do Amazonas são *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. naiffi* (Figura 5), verificou-se uma média em 2010 de 1.130 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 32,40 casos/100.000 habitantes (MS, 2010).

Nas florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), particularmente em áreas de “igapó” e de floresta tipo “várzea” está presente a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Tem como hospedeiros naturais: marsupiais (*Didelphis* spp.) e roedores, principalmente “rato soia” (*Proechimys* spp.), além do *Oryzomys*, que apresentam, em geral, somente a infecção, com parasitos na pele aparentemente normal. Os vetores são espécies do complexo *Lutzomyia flaviscutellata*, de hábitos noturnos e vôo baixo, sendo pouco antropofílico (LAINSON & SHAW, 1978; LAINSON, 1981; MS, 2007).

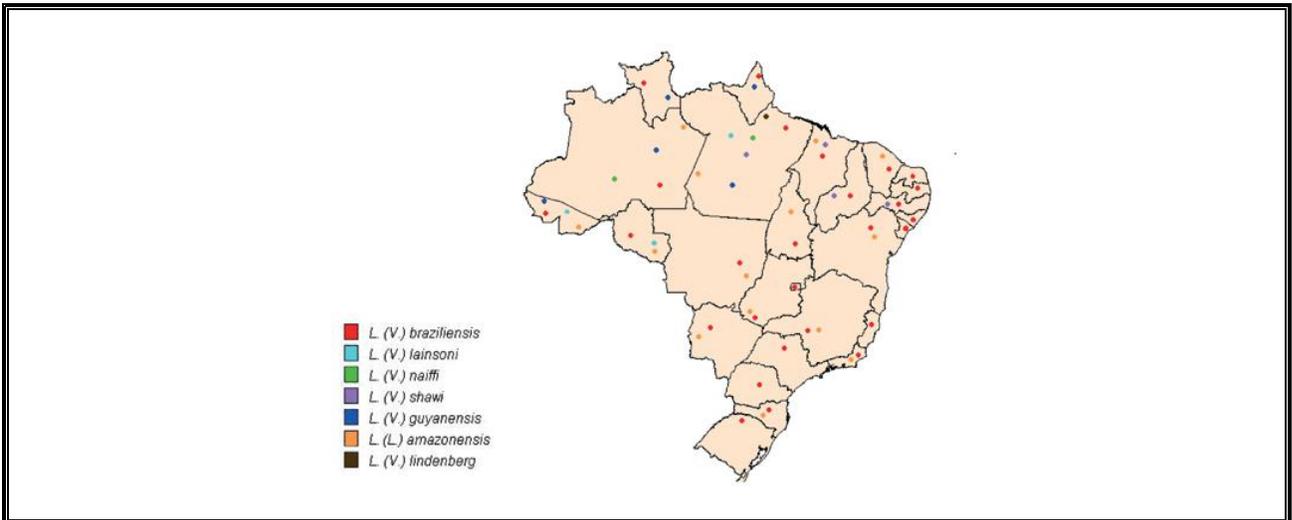


Figura 5 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil 2005.

Fonte: SVS/MS, 2007.

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem ampla distribuição, da Amazônia ao sul do país. Na Amazônia, a infecção é encontrada em áreas de selva, de terra firme. Os hospedeiros naturais são desconhecidos e o único vetor conhecido é o *Psychodopigus wellcomei* (Serra dos Carajás), altamente antropofílico, picando o homem mesmo durante o dia e com grande atividade na estação úmida, em florestas de terra firme (FNS, 2002; MS, 2007).

Aparentemente limitada ao norte da bacia amazônica (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, encontra-se associada à floresta de terra firme, não inundável. Vários mamíferos selvagens são incriminados como hospedeiros naturais, principalmente a preguiça de dois dedos (*Choleopus didactylus*) e o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), além de marsupiais (*Didelphis marsupialis*) que passam a conviver próximo ao homem após os desmatamentos. O vetor incriminado, *Lutzomyia umbratilis* (35% dos flebotomos capturados), costuma pousar durante o dia em troncos de árvores, ataca o homem com grande intensidade quando perturbado e pode invadir habitações próximas à mata até 80 m (LAINSON & SHAW, 1978; LAINSON, 1981; WHO, 1990; MS, 2007).

Um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas pode ser visto na LTA, variando desde uma lesão auto-resolutiva a lesões múltiplas ou desfigurantes. De modo geral, a maioria das infecções leishmanióticas permanece localizada na pele ou linfonodos adjacentes. Entretanto, algumas espécies podem escapar para mucosas, múltiplos locais na pele ou para fígado, baço e linfonodos distantes. Os pontos de disseminação da doença variam principalmente, mas não exclusivamente, devido a diferentes propriedades do parasito: sensibilidade a temperatura, tropismo tecidual, capacidade de imunoevasão e persistência (MURRAY *et al.*, 2005).

O polimorfismo clínico das leishmanioses se deve principalmente ao parasita e isso é demonstrado em diversos estudos sobre a correlação entre determinados genótipos de espécies e cepas de *Leishmania* e manifestações clínicas da doença (REITHINGER *et al.*, 2007). A LTA pode ser agrupada em três formas clínicas básicas:

- Leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por uma infecção confinada na derme, com formação de úlceras únicas ou múltiplas, com a epiderme ulcerada, sendo causadas normalmente pelas espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi* e *L. laisoni*. A infecção pode evoluir após o período de incubação de 1 a 12 semanas, em uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente ulcera. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico granuloso e úmido (Figura 6A).
- Leishmaniose mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões na derme com úlceras, podendo ocorrer lesões metastáticas com invasão de mucosas e da cartilagem, sendo causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. panamensis* (SARAVIA *et al.*, 1985). Manifestação mais severa da LTA, nunca cura espontaneamente e é de difícil tratamento. Pode ocasionar destruição de

cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo. Nos casos mais graves, o paciente pode morrer por complicações respiratórias, dificuldades de alimentação ou infecções secundárias (Figura 6B) (HEPBURN, 2000).



Figura 6 - Manifestações clínicas (A) lesão cutânea típica; (B) lesão mucocutânea e (C) lesões cutâneas difusas. Fonte: (A) <http://sisbib.unmsm.edu.pe>; (B) <http://www.latinpharma.net>; (C) <http://www.tulane.edu>.

- Leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada por uma infecção confinada à derme, formando nódulos não ulcerados, tendo disseminação por todo corpo, sendo causada pela espécie *L. amazonensis*. Caracteriza-se por nódulos não ulcerados, repletos de parasitos que se disseminam do local original de infecção e pode cobrir todo o corpo do paciente. Esta manifestação da doença é típica em pacientes com anergia do sistema imune, sendo comum em casos de co-infecção HIV/Leishmania (Figura 6C) (REITHINGER *et al.*, 2007).

O controle da LTA traz perspectivas complexas, envolvendo educação, informação, promoção de saúde, conhecimento de casos suspeitos, diagnóstico e tratamento precoces, identificação do agente etiológico, conhecimento das áreas de transmissão, redução do contato homem-vetor, devendo ser específico conforme a situação epidemiológica de cada região (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

3.1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A infecção por *Leishmania* sp. causa um espectro de doença que varia de lesões autocicatrizantes a infecções disseminadas e fatais, dependendo da espécie do parasita e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. A resistência depende da geração do tipo de resposta celular Th1 ou Th2 estabelecido em reação aos antígenos de *Leishmania*, e de outros fatores, como variação genética e condição nutricional, podem influenciar a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção. De modo geral, entre os fatores de virulência intrínsecos ao parasito, está sua capacidade de escapar ao estresse oxidativo no interior de macrófagos ativados (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; LIESE *et al.*, 2008).

Em modelos experimentais murinos de leishmaniose tegumentar, pode-se observar que os linfócitos T auxiliares (Th) CD4⁺ estão subdivididos em duas subpopulações funcionalmente diferentes no que se refere à secreção de citocinas, diretamente correlacionadas com a resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*: o subtipo Th1 conduziria à eliminação do patógeno e é marcado principalmente pela produção de IFN- γ (interferon gama) e interleucina (IL)-2. O subtipo Th2 levaria à lesões que não se curam, à disseminação do parasito e ao desenvolvimento da forma visceral e fatal da doença, e é marcado principalmente pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Vários fatores têm sido implicados na diferenciação da célula T CD4⁺ em Th1 ou Th2, como tipo de célula apresentadora de antígeno, os níveis de citocinas endógenas e a natureza do antígeno reconhecido. Estas manifestações são causadas pelo perfil genético do animal, que irá determinar as citocinas a serem produzidas para direcionar a diferenciação dos linfócitos T auxiliares (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Ainda na resposta imune celular, tem sido sugerido que o linfócito T CD8 poderia contribuir pela produção de IFN- γ , e ainda

promoveria citotoxicidade destruindo os macrófagos infectados, mas estes mecanismos ainda não se encontram totalmente esclarecidos (RUIZ & BECKER, 2007).

O mecanismo da resposta imune encontra-se bem definido no modelo experimental, estando envolvidas no processo de eliminação dos patógenos macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK), linfócitos T (CD4 e CD8), citocinas (principalmente IFN- γ e IL-12) e moléculas efetoras (BOGDAN *et al.*, 1993; SOLBACH & LASKAY, 2000). A resposta anti-leishmânia pode ser dividida em fases de acordo com as células ativadas e envolvidas (VON STEBUT, 2007):

- Primeira fase ocorre a invasão de forma “silenciosa” dos macrófagos presentes no tecido subcutâneo devido aos receptores de membrana que permitem a entrada da leishmânia na célula, com o acúmulo de parasitos nos macrófagos e sem a ocorrência de lesão;
- Segunda fase acontece a migração e ativação das células do sistema imune inato, como os mastócitos residentes, os neutrófilos e os monócitos, e as lesões se tornam proeminentes;
- Terceira fase ocorre a imigração das células dendríticas e linfócitos T e coincide com a involução da lesão;
- Fase crônica, os parasitos remanescentes contribuem para a manutenção da imunidade pelo resto da vida do indivíduo.

Das células da imunidade inata referidas acima, os mastócitos estão envolvidos com o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para o local da infecção e estas últimas, por sua vez, irão migrar para os órgãos linfóides a fim de ativar os linfócitos T e gerarem a resposta protetora ao parasito (MAURER *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2008). Os neutrófilos, por sua vez, possuem um papel controverso dentro da imunidade inata, pois ao mesmo tempo em

que são ativos na fagocitose das leishmânias, entram em apoptose e, ao serem fagocitados, permitem a entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, seus hospedeiros finais. Outra possibilidade sugerida é que ao fagocitar neutrófilos que sofreram apoptose, seria gerado nos macrófagos um ambiente anti-inflamatório, e quando estes fagocitassem parasitos liberados pela morte dos neutrófilos, seriam incapazes de destruí-los (AFONSO *et al.*, 2008; JOHN & HUNTER, 2008).

Os macrófagos são células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), desta forma, sua função primária é a fagocitose. Desempenham papéis centrais na imunidade inata, interiorizam e destroem patógenos invasores, instruem a resposta adaptativa pela apresentação de antígenos, eliminam restos celulares derivados de células mortas, eliminam células apoptóticas durante o desenvolvimento e podem mediar a reabsorção óssea, como os osteoclastos (BURKE & LEWIS, 2002). Estão estrategicamente posicionadas em todos os locais onde microorganismos podem entrar no hospedeiro, ou seja, no tecido conjuntivo subepitelial, no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Estas células possuem um papel intrigante na leishmaniose, pois servem ao mesmo tempo como células hospedeiras para os parasitos e como células regulatórias da resposta imune e efetoras equipadas para destruir estes microorganismos (RAVETCH & ADEREM, 2007).

Em resposta à fagocitose ocorre a ativação do macrófago, que pode ser definida como a aquisição induzida por estímulo de uma nova capacidade funcional (BURKE & LEWIS, 2002). Estas células produzem, no fagolisossomo, intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio com o objetivo de eliminar a partícula estranha. Realiza também outras funções efetoras, como a produção de citocinas da imunidade inata, produção de fatores de crescimento de fibroblastos, de

fatores angiogênicos e de metaloproteinases para remodelagem tecidual e fazem também a degradação de proteínas e processamento de antígeno para apresentação às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), para que as células T possam reconhecer as substâncias estranhas ao organismo (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A produção de citocinas se dá em resposta a microorganismos invasores, além de outros estados fisiopatológicos como inflamação, trauma e malignidade e seus efeitos não estão limitados a células do sistema imune (SOUBA, 1994). O IFN- γ secretado por linfócitos Th1, tem papel importante na defesa contra microorganismos intracelulares como a *Leishmania*, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). É uma citocina importante produzida por diversas células do sistema imunológico, em especial por macrófagos ativados, tem um papel central na regulação de mediadores, tanto pró quanto anti-inflamatórios. Macrófagos infectados por *Leishmania* estão inibidos para a produção desta citocina assim como para outras respostas inflamatórias (OLIVIER *et al.*, 2005).

Estudos anteriores em modelos experimentais têm servido como embasamento para a elucidação dos mecanismos imunológicos relacionados às leishmanioses. Nestes modelos de resistência e susceptibilidade, camundongos resistentes à infecção por este parasita apresentam uma alta produção de TNF- α (KEDZIERSKI *et al.*, 2009). Entretanto o camundongo BALB/c, referido como susceptível, produz citocinas do perfil Th2, em particular, IL-4 e IL-10 em resposta à infecção, conduzindo à progressão da doença (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Além de citocinas, macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em resposta a estímulos externos (BEUTLER, 2004).

Em resposta a estímulos ou a fagocitose, o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase é ativada na membrana do macrófago e prótons do oxigênio

molecular são transferidos, ocorrendo o “burst” respiratório. O “burst” respiratório é caracterizado pela formação de uma alta concentração de espécies reativas do oxigênio (ERO), ou seja, ocorre um aumento rápido no consumo de oxigênio onde há produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que interagem com os fosfolipídios de membrana do parasita (CUNNINGHAM, 2002). Halliwell (1987) sugeriu que as ERO estão relacionadas com patologias humanas, como artrite reumatóide, injúria de reperfusão, trauma cerebral e isquemia.

Durante o “burst” respiratório, ocorre a redução do oxigênio (O_2) a O_2^- , que é liberado para o meio extracelular. O NADPH é utilizado como doador de elétrons e a enzima flavocitocromo oxidase b558 (componente do complexo NADPH oxidase) participa da reação. A flavoproteína b558 foi localizada tanto na membrana quanto no citoplasma de macrófagos. O O_2^- gerado é subsequentemente convertido em H_2O_2 , com a ajuda da enzima superóxido dismutase (Figura 7). O H_2O_2 possui uma variedade de papéis no corpo humano. Atua como molécula sinalizadora, é um agente citotóxico no sistema de defesa e também pode causar doenças (PICK & KEISARI, 1980; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

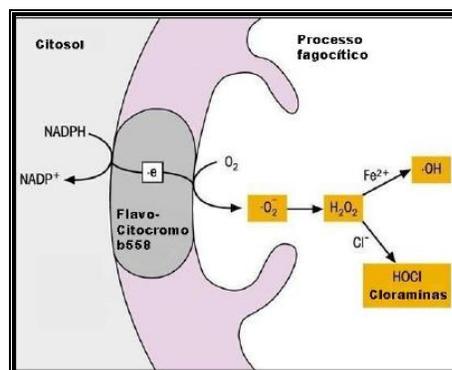


Figura 7 - Produção dos intermediários reativos do oxigênio.

Fonte: Adaptado de Roitt & Delves, 1997.

Os produtos do “burst” respiratório e seus derivados incluem O_2^- , H_2O_2 , ácidos hipoácidos, radical hidroxil (-HO), entre outros (NATHAN, 2006). O O_2^- é pouco reativo, quando gerado intracelularmente, ele exerce sua toxicidade inibindo enzimas bacterianas que contém clusters (Fe – S). Simultaneamente é liberado o Fe^{2+} , que pode converter o H_2O_2 em -HO pela Reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + OH^- + -HO$). Por isso, o H_2O_2 é considerado um radical livre “encoberto” (YUNES & CALIXTO, 2001).

O O_2^- gerado no fagolisossomo parece não atravessar a parede celular das bactérias. É proposto que sua função possa estar relacionada com a criação de ambiente favorável a proteases e não com a toxicidade direta em microorganismos (HALLIWELL, 2006). Porém, o H_2O_2 gerado no fagolisossomo é capaz de entrar na célula bacteriana e formar o -HO, fatal para o microorganismo. Entretanto, a presença de lactoferrina no fagolisossomo, uma proteína capaz de se ligar ao ferro livre, impede que este radical seja formado em grande quantidade (SEGAL, 2005; HALLIWELL, 2006).

Estes agentes podem potencializar a resposta destas células ao estímulo do qual originou o “burst” respiratório (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O forbol miristato acetato (PMA), o IFN- γ e o muramil dipeptídio da parede bacteriana, são capazes de induzir a produção de ERO *in vitro* (PICK & KEISARI, 1980). O PMA é um dos agentes capazes de induzir a liberação de H_2O_2 pelos macrófagos. É um estimulante químico hidrofóbico que pode atravessar a membrana citoplasmática do fagócito independente de receptor e é capaz de se ligar e também ativar a proteína quinase C, causando uma grande variedade de efeitos nas células, podendo promover o *stress* oxidativo (BENDER *et al.*, 1983; BLUMBERG, 1980).

Os macrófagos também produzem como resposta á fagocitose o agente oxidante óxido nítrico (NO). Atualmente, sabe-se que o NO é efetivo contra vários patógenos, incluindo *T. cruzi*,

T. musculus, *M. avium*, *M. leprae*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans* e *L. major*. É um gás altamente permeável a membranas e quando produzido sua principal função é microbicida, pode ser tóxico ao microorganismo fagocitado, quando combinado ao H_2O_2 é convertido a peroxinitrito dentro dos fagolisossomos (SONG *et al.*, 2002; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A síntese do NO é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da oxidação do átomo de nitrogênio guanidínico terminal da L-arginina. Existem pelo menos três isoformas da enzima (Figura 8A), codificadas por três genes diferentes, a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), sendo que a última é a forma presente em macrófagos (KIECHLE & MALINSKI, 1993). A síntese envolve duas etapas (Figura 8B): na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA), esta reação utiliza NADPH e O_2 e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS; na segunda, ocorre a conversão da NHA em NO e L-citrulina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH4) são utilizados como cofatores na reação (MARLETTA *et al.*, 1988; MARLETTA, 1994).

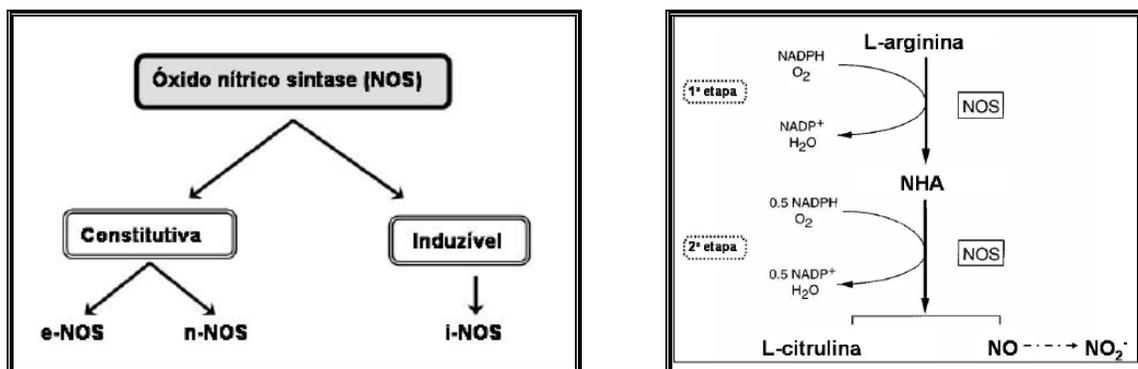


Figura 8 – (A) Isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). (B) Reação bioquímica de síntese do NO em células de mamíferos.

Fonte: (A) DUSSE *et al.*, 2003; (B) Adaptado de MacMicking *et al.*, 1997.

As citocinas são importantes moduladoras da expressão da iNOS em macrófagos infectados, de uma maneira geral, citocinas do perfil Th1 com produção de IL - 12, IFN- γ e TNF- α induzem a iNOS, enquanto as do padrão Th2 inibem a sua indução (XIE *et al.*, 1992; NATHAN & XIE, 1994).

Aspectos da fisiologia dos macrófagos são influenciados de alguma forma pelo lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. A estrutura do LPS é anfipática, composta de uma porção polissacarídica covalentemente ligada à região hidrofóbica do lipídeo A. O LPS induz um aumento do consumo de glicose e oxigênio e a célula adquire a capacidade de eliminar microrganismos e células tumorais. Os macrófagos também desenvolveram um mecanismo refinado para reconhecer LPS no ambiente e, portanto ele é um dos mais potentes estimuladores. Em muitos casos experimentais, com macrófagos de camundongos e ratos, apenas 1 pg/mL produz resposta mensurável, induzindo a expressão de iNOS (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994).

O LPS também é um potente imunorregulador. No início da resposta da fase aguda, o lipídeo A do LPS interage com a proteína CD 14 que está presente nas células mononucleares e em outras células, como nos granulócitos, nas células endoteliais, etc. A ligação do LPS ao CD 14 e a subsequente resposta celular são facilitadas pela proteína ligante do lipopolissacarídeo (LBP). Contudo existem várias células que não expressam CD 14, e também são capazes de responder ao LPS. Esse fato pode, talvez, indicar a existência de receptores de LPS independentes de CD14 (LANGHANS, 1996).

3.2 FÁRMACOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

A primeira escolha na terapia da leishmaniose são medicamentos à base de antimônio, dentre eles destacam-se o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Figura 9) (RATH *et al.*, 2003).

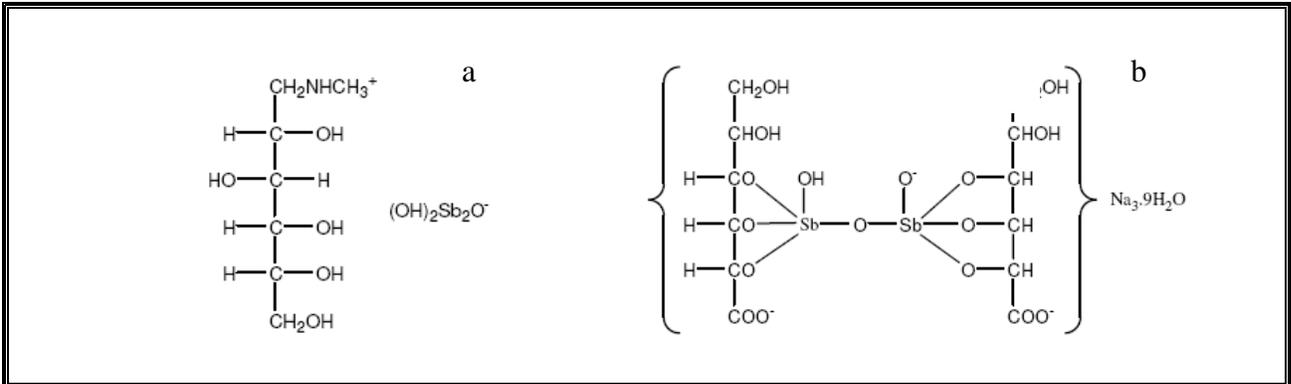


Figura 9 - Fórmula estrutural de (a) Antimoniato de N-metil-glucamina e (b) Estibogluconato de sódio.
Fonte: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/cutaneous>.

Acredita-se que o mecanismo de ação dos antimoniais é baseado na interferência do processo bioenergético das formas amastigotas de leishmania. Os produtos desta interferência bloqueiam e inibem diferentes proteínas do parasita, particularmente enzimas envolvidas na glicólise e oxidação de ácidos graxos, resultando numa redução na produção de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de LC, LMC e LV, provocando regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, podendo levar a eliminação do parasita. Porém, devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começam a ocorrerem falhas na terapia e, conseqüentemente, o aumento da resistência destes parasitas. A OMS preconiza que as doses não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia e 850 mg de

antimônio, devido sua alta toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso destas drogas (RATH *et al.*, 2003).

Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido empregados como drogas alternativas no tratamento da leishmaniose, entre os quais se destacam a anfotericina B (Figura 10) e o isotionato de pentamidina (Figura 11) utilizadas nas formas resistentes e no tratamento convencional. Vale enfatizar que, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas é frequente, sendo de 2% nos casos tratados e ao redor de 10% nos casos não tratados (BASANO & CAMARGO, 2004).

O antibiótico poliênico anfotericina B é uma droga padrão usada no tratamento de infecções fúngicas e altamente eficaz, no entanto apresenta elevada toxicidade. Seu mecanismo de ação está relacionado com a sua ligação aos esteróides da membrana fúngica, atuando no ergosterol da membrana celular. Como a membrana da leishmânia contém ergosterol, a droga altera sua permeabilidade, com a perda de pequenos cátions, particularmente K^+ , causando a morte celular (ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Porém seu uso é limitado pelos efeitos adversos como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos pacientes (MOTTA, 2006). A forma lipossomal age especificamente sobre as células alvo (macrófagos), sendo incorporada ao meio intracelular e, assim reduzindo os efeitos colaterais com maior índice de eficácia terapêutica (PAULA *et al.*, 2003).

A pentamidina, além de ser relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, é eficaz no tratamento de casos incipientes de *Tripanossomíase gambiense* ou *T. rodesiana*. A substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais ou para pacientes com

Calazar que sejam hipersensíveis ao antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso, hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (RATH *et al.*, 2003). Quanto ao mecanismo de ação, sabe-se que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto do parasito. Há dois sais de pentamidina, o isotionato de pentamidina (Pentamidina®), disponível nos EUA e Europa, e o mesilato de pentamidina, disponível apenas na Europa (Lomidine®). Diferem entre si quanto à dose e efeito diabetogênico (PAULA *et al.*, 2003).

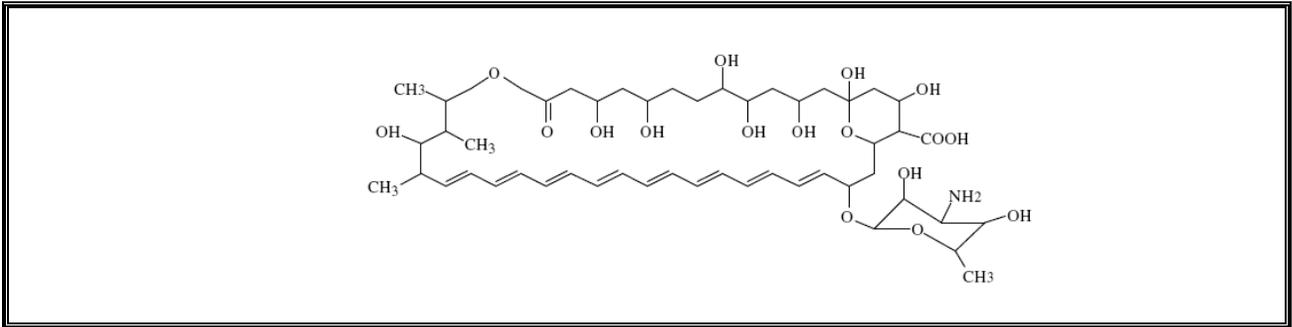


Figura 10 - Fórmula estrutural da Anfotericina-B.

Fonte: <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/seminarioAntibioticos2.htm>.

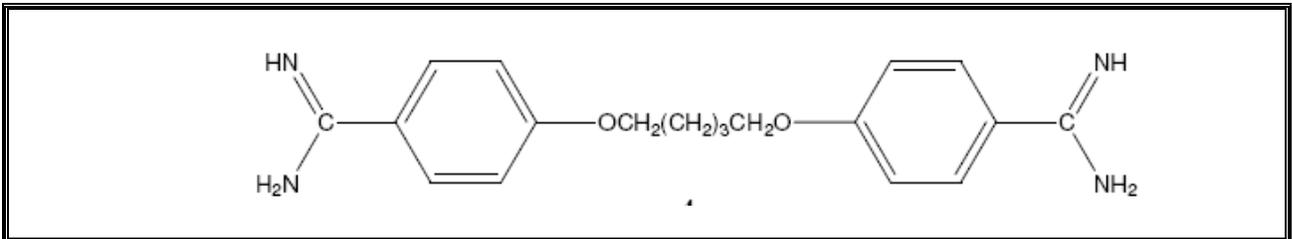


Figura 11 - Fórmula estrutural de Isotionato de Pentamidina.

Fonte: <http://www.hfchen.cn/template/Pentamidine-Isethionate.htm>.

O tratamento tradicional apresenta vários inconvenientes, tais como as vias de aplicação, que são intramuscular ou endovenosa, que podem ser dolorosas e desconfortáveis. Além disso, estas drogas precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que muitas vezes

requer hospitalização acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos. Também apresentam alta toxicidade e resistência, quando administrados por um longo período acarretam hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, e até mesmo, mortes repentinas (RATH *et al.*, 2003; TEMPONE *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2007).

Atualmente, todos os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são injetáveis, a miltefosina pode vir a ser o primeiro tratamento oral para a LV, muito embora apresente também alta toxicidade (RATH *et al.*, 2003; SINDERMANN *et al.*, 2004). A miltefosina (Figura 12) (hexadecilfosfocolina), medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, na década de 80, durante a sua avaliação para esta finalidade terapêutica, descobriu-se a sua potente ação contra leishmanias. Esta droga age interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, depois modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolipídeos, induzindo morte celular por apoptose (COSTA FILHO *et al.*, 2008).

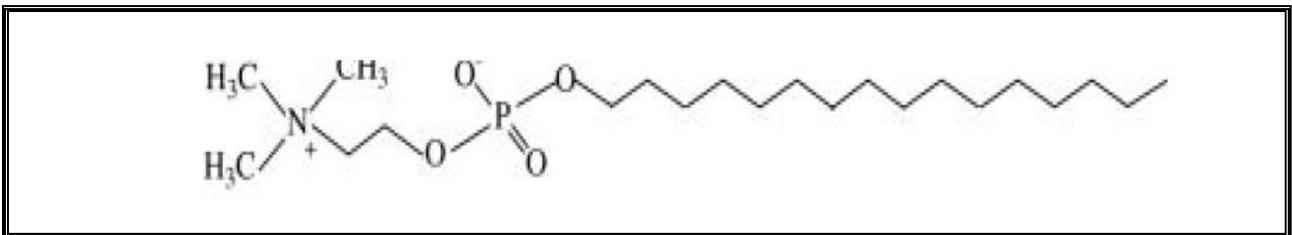


Figura 12 - Fórmula estrutural da Miltefosina.
Fonte: COSTA FILHO *et al.*, 2008.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de desenvolver uma vacina antileishmaniose tegumentar americana para fins profiláticos e terapêuticos, porém os resultados têm sido controversos. Por exemplo, num ensaio clínico randomizado, Hueb e colaboradores (2007) concluíram que a taxa de cura obtida pela vacina (*Leishvacin*®) foi inferior à observada

em outros estudos enquanto que a cura obtida com o antimonial mostrou-se igual ou acima do esperado. Em outro estudo, Mayrink e colaboradores (2006) concluíram que a associação da vacina com o antimônio apresentou o mesmo índice de cura em relação ao tratamento padrão (100%), e ainda reduziu o volume do sal em 17,9% e o tempo de cura significativamente, de 87 para 62 dias; conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais.

Para a utilização de novos quimioterápicos em humanos, faz-se necessário prévia avaliação desses compostos *in vitro* e *in vivo*. Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antileishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. Entre estes incluem: inibidores do metabolismo de folatos, inibidores da síntese de poliaminas, inibidores da síntese de tubulinas, inibidores da biossíntese de esteróides, inibidores de DNA topoisomerases, complexos organometálicos e inibidores da via de óxido nítrico (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

3.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS PLANTAS

O Brasil é reconhecido pela exuberância e variedade de plantas tropicais, sendo algumas amplamente utilizadas na medicina popular (SUFREDINI *et al.*, 2004). Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES *et al.*, 2000).

Alguns estudos indicam que, se a seleção das plantas é feita baseada no uso tradicional, as possibilidades de sucesso da pesquisa são maiores (TROTTER *et al.*, 1982; ELISABETSKY &

WANNMACHER, 1993). Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (YUNES & CALIXTO, 2001).

O uso de plantas no tratamento da LTA é uma prática antiga entre as populações das áreas endêmicas (FOURNET *et al.*, 1992; MOREIRA *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 2002). Geralmente, as preparações vegetais são utilizadas por via oral ou tópica sobre as lesões cutâneas (NETTO *et al.*, 1985; IWU *et al.*, 1994; AKENDENGUE *et al.*, 1999). Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na LTA pode ocorrer a cura espontânea das lesões (MARSDEN *et al.*, 1984; COSTA *et al.*, 1990; ROSSELL *et al.*, 1992; MARSDEN, 1994).

De acordo com a OMS, as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos que, por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SIMÕES *et al.*, 2003). São apropriadas para o desenvolvimento de novos agentes medicinais, o que estimula uma busca por tratamentos alternativos derivados de produtos naturais com potencial na terapia das leishmanioses (ROCHA *et al.*, 2005).

Com o avanço das pesquisas, foram atribuídas aos metabólitos secundários, importâncias relevantes nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos moluscos ou animais superiores (NIERO *et al.*, 2003). Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida e/ou anti-leishmania (IWU *et al.*, 1994; QUEIROZ *et al.*,

1996; TORRES-SANTOS, 1999; KAM *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2006).

Em virtude da biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda para produtos naturais por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais. Um amplo estudo pode ser mais efetivo se a investigação abranger o potencial farmacológico de várias espécies de um determinado gênero guiado pelo uso medicinal popular.

3.3.1 ANNONACEAE

A família Annonaceae é uma ampla família de árvores aromáticas, arbustos, ou lianas, que ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Esta família compreende cerca de 135 gêneros e mais de 2500 espécies, sendo a maior representante da ordem Magnoliales. Praticamente um terço das espécies pertence a cinco gêneros, *Guatteria* (250), *Uvaria* (175), *Xylopia* (160), *Polyalthia* (150) e *Annona* (120) (LOBÃO, 2005). A distribuição da família Annonaceae no mundo (Figura 13) consiste de 50 gêneros encontrados na Ásia e Austrália, 34 gêneros na África, enquanto no continente Americano são conhecidos 39 gêneros (BRUMMITT, 1992). Segundo Walker, a família Annonaceae é originária da Ásia e Austrália, e mais recentemente, Lê Thomas, descreveu que esta família teve origem na África ou na América do Sul (LE BOEUF *et al.*, 1982).

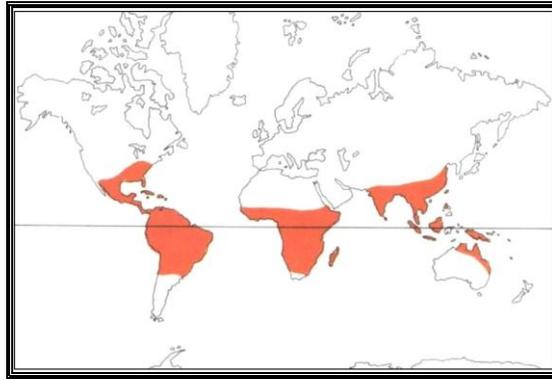


Figura 13 - Distribuição mundial das espécies da família Annonaceae.
Fonte: Heywood, 1978.

No Brasil, a família Annonaceae compreende 29 gêneros e cerca de 260 espécies. Os gêneros mais conhecidos no Brasil são *Annona*, *Xylopia* e *Rollinia* (atualmente incorporado em *Annona*; RAINER, 2007; MAAS *et al.*, 2010), apresentam considerável riqueza de espécies principalmente na região amazônica e na floresta atlântica (LE BOEUF *et al.*, 1982; LOBÃO, 2005). A partir da década de 80, um novo estímulo surgiu para o estudo fitoquímico desta família, devido ao isolamento de uma nova classe de substâncias naturais bioativas, conhecidas como “acetogeninas de anonáceas” (RUPRECHT *et al.*, 1990) que apresentaram uma gama de importantes atividades biológicas tais como: citotóxica, antitumoral, pesticida, vermífuga, abortiva, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, antiviral, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antiprotozoário (RUPRECHT *et al.*, 1990; CAVÉ *et al.*, 1997, OSÓRIO, 2006).

3.3.1.1 *Annona mucosa*

A espécie *A. mucosa* (Jacq.), é uma anonácea que se encontra em estado silvestre e cultivada, na América do Sul, Central e América do Norte (na Flórida), nas Antilhas, na região do

Caribe e em boa parte do Brasil devido ao clima que favorece o seu desenvolvimento. É conhecida popularmente como biribá, fruta-da-condessa, condessa ou beribá. Floresce de julho a setembro, frutificando de novembro a maio, podendo ser encontrado no decorrer do ano nas feiras populares (MANICA, 2000). A *A. mucosa* tem como sinonímia *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill, pertence ao gênero *Rollinia*, o qual atualmente foi incluído no gênero *Annona* (RAINER, 2007; MAAS *et al.*, 2010).

É uma árvore de aproximadamente 4 - 15 m de altura; folhas alternas, pecioladas; fruto sincarpo, carnoso, ovóide, pericarpo cheio de saliências piramidais; polpa branca, mole, suculenta, de sabor adocicado; sementes numerosas, castanho-escuras; casca amarela quando maduro (FALCÃO *et al.*, 1981).

Os frutos (Figura 14) são comestíveis e usados em sucos quando frescos e em vinhos quando fermentados. São utilizados para produção de refrigerantes, analépticos, e considerados anti-escorbúticos. O seu lenho é usado para mastros de navios (CORRÊA, 1969). A madeira é empregada na confecção de esteios, canoas, pranchas e caixas. As fibras são aproveitadas para fazer estopas. As sementes reduzidas a pó são usadas contra a enterocolite (LE COINTE, 1947; PRACE & SILVA, 1975). Estudos químicos e farmacológicos revelaram a presença de alcalóides, acetogeninas de Annonaceae e lignoides, de comprovadas ações antiprotozoário, antimicrobianas e antifúngicas (CHEN *et al.*, 1996; ALALI *et al.*, 1999), sugerindo um grande potencial químico e farmacológico.



Figura 14 - Fruto de *Annona mucosa*.
Fonte: www.oiyakaha.org.

3.3.1.2 *Annona sericea*

A espécie *A. sericea* Dunal, é uma anonácea que se encontra em estado silvestre, originária da Amazônia, comum nas florestas tropicais e savânicas das Guianas, é frequente na capoeira de terra firme, em solos argilosos (ROOSMALEN, 1985; REVILLA, 2002). Conhecida popularmente como araticum-do-mato, araticum-alvadio, araticum-de-guaratinguetá, araticum-de-porco, cortiça, pinha (MAAS, 2010).

Árvores ou arbustos com até 7m de altura, folhas lanceolada-oblongas ou elíptico-lanceoladas; inflorescência pauciflora; flores com sépalas triangulares arredondadas nos ângulos (BERG, 1978). Fruto sincarpo ovóide, verde a amarelo, rodeado com numerosos espinhos, rígido, um pouco recurvado; sementes com 0,6 - 0,7 cm de comprimento (ROOSMALEN, 1985). É perene, floresce no mês de setembro e frutifica no mês de dezembro (CNIP, 2002). O fruto (Figura 15) é seguramente comestível para os seres humanos (ROOSMALEN, 1985). Utilizada na medicina popular sob a forma de tintura alcoólica, possui propriedades anti-reumáticas em suas folhas e casca do tronco (BERG, 1978).



Figura 15 - Fruto de *Annona sericea*.
Fonte: <http://www.beniclub.eu/Piante/A.htm>.

Estudos fitoquímicos de suas folhas (CAMPOS *et al.*, 2008) levaram ao isolamento de dois alcalóides oxoaporfínicos: oxonuceferine (Figura 16-1) e oxonantenina (Figura 16-2); quatro alcalóides aporfínicos: nornuceferina (Figura 16-3), nornanteninina (Figura 16-4), isoboldina (Figura 16-5) e 3-hidroxi nornuceferina (Figura 16-6); e dois alcalóides benziltetrahydroquinolinas: (S)-reticulina (Figura 16-7) e (S)-N-metilcoclaurina (Figura 16-8).

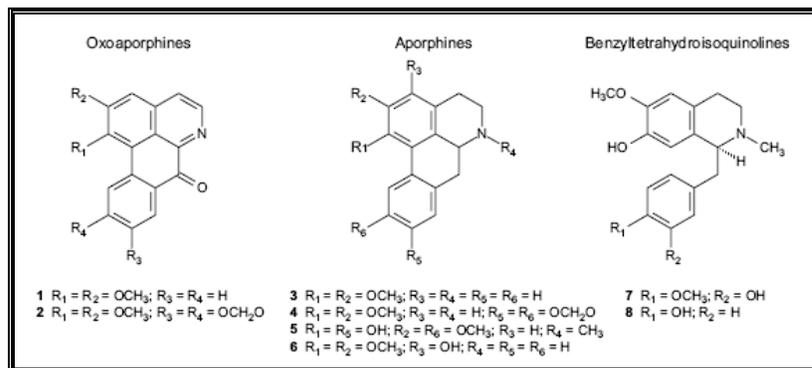


Figura 16 – Estruturas químicas de alcalóide isolados de folhas de *Annona sericea*.
Fonte: Campos *et al.*, 2008.

3.3.1.3 *Ephedranthus amazonicus*

A espécie *E. amazonicus* R. E. Fr é uma anonácea que se encontra em estado silvestre na Amazônia, Venezuela, Peru, Brasil e Bolívia. Encontrada em florestas de terra firme,

especificamente em solos argilosos. É conhecida popularmente como envira, envira-dura, envirapreta, envira-surucucu, envirataia, envireira, envireira-dura. Floresce de março a maio, a frutificação de maio a setembro (MAAS, 2007).

É uma árvore de aproximadamente 4 - 15 m de altura, ramos jovens e pecíolos subglabrous, folhas dísticas (Figura 17), sem brilho para o verde glauco; inflorescências em zona foliate para ramiflorous; flores creme, macho e bissexuais; frutas apocarpous, verde; 1 semente por monocarpo, basal, de coloração marrom brilhante, elipsóide. Os frutos podem ser confundidos com *Guatteria*, mas as sementes de ambos os gêneros são bem diferentes, os de *E.* são maiores, com listras horizontais, e com receptáculo lenhoso (MAAS, 2007).



Figura 17 - Folhas de *Ephedranthus amazonicus*.
Fonte: <http://fm1.fieldmuseum.org>

Estudos anteriores revelaram a presença dos alcalóides liriodenina (Figura 18-1), lisicamina (Figura 18-2), O-metilmoschatolina (Figura 18-3), isomoschatolina (Figura 18-4) e 9-metoxi-isomoschatolina (Figura 18-5) em folhas e galhos finos (ALENCAR *et al.*, 2011).

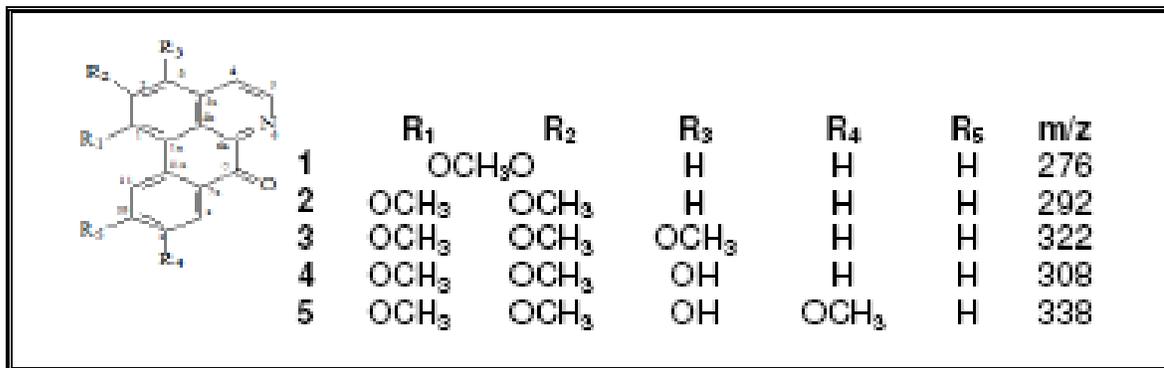


Figura 18 - Estruturas químicas de alcalóides isolados de folhas de *Ephedranthus amazonicus*.
Fonte: Alencar *et al.*, 2011.

3.3.2 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

Estudos fitoquímicos de espécies vegetais proporcionam avanços nas pesquisas de novos fármacos, na busca por princípios ativos, estas pesquisas são guiadas por bioensaios *in vivo* e *in vitro* (YUNES & CALIXTO, 2001). A literatura relata uma variedade de produtos naturais com atividade antiprotozoário, que incluem moléculas ativas contra os agentes causadores da leishmanioses. Estudos sobre a medicina tradicional praticada pelas comunidades colombianas levaram à descoberta de que as plantas da família Annonaceae são utilizadas como agentes antiparasitários (BLAIR *et al.*, 1991; WENIGER *et al.*, 2001; SCHWIKKARD & HEERDEN, 2002). Algumas espécies da família Annonaceae têm sido amplamente estudadas em todo o mundo, quanto ao seu potencial farmacológico, buscando inicialmente isolamento e modificações estruturais para produção de futuros medicamentos com bioatividade alta e baixa toxicidade (SERNA & CARDONA, 2006).

Estudos químicos e farmacológicos de metabólitos encontrados em várias partes das plantas da família Annonaceae têm revelado a presença de alcalóides, acetogeninas, esteróis, terpenos e lignanas de comprovadas ações antiprotozoário. Estas atividades constam dos apêndices a seguir relacionados: 9.1.1 Extratos e frações da família Annonaceae com atividade

leishmanicida *in vitro* em formas promastigotas., 9.1.2 Moléculas definidas da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas promastigotas., 9.1.3 Extratos e frações da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas intracelulares., 9.1.4 Moléculas definidas da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas intracelulares., 9.1.5 Citotoxicidade de extratos e frações da família Annonaceae em células. e 9.1.6 Citotoxicidade de moléculas definidas da família Annonaceae em células. As anonáceas são largamente empregadas na etnofarmacologia devido às suas diferentes propriedades farmacológicas atribuídas principalmente as acetogeninas e alcalóides, dois dos principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos das anonáceas.

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas predominantemente em angiospermas (BOTSARIS, 2002). São substâncias orgânicas cíclicas que contêm um nitrogênio em estado de oxidação negativo, sendo distribuídas somente entre os organismos vivos. Estão presentes em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (HENRIQUES *et al.*, 1999). Os alcalóides são aqueles que apresentaram nos últimos anos bioatividade para diferentes espécies de *Leishmania* (CHEN *et al.*, 1996; LIAW *et al.*, 1999; SANTOS PIMENTA *et al.*, 2001; FAGUNDES *et al.*, 2005; OSORIO *et al.*, 2006).

Embora o mecanismo de ação de alcalóides em *Leishmania* spp. ainda não esteja compreendido, é sugerido que alcaloides benzilisoquinolínicos são inibidores de enzima antioxidante de *Leishmania*, Trypanotiona redutase e estão aptos a intercalar no DNA (FOURNET, 2000; BRAGA, 2007). Os alcalóides podem afetar a mitocôndria de macrófagos, aumentando o seu tamanho (DELORENZI *et al.*, 2001). Além disso, foi sugerido que estruturas oxoaporfínicas totalmente planares são potentes inibidores de topoisomerase II (WOO, 1999).

Acredita-se que existe uma correlação entre a estrutura química e do comprimento do grupo de substituição, é provável que a estrutura destes componentes pode influenciar significativamente a atividade sobre os parasitas (STAERK *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

As acetogeninas são substâncias naturais presentes nas cascas, raízes e, principalmente, em sementes de representantes da família Annonacea. São caracterizadas por apresentarem um esqueleto constituído de 32 a 34 átomos de carbono, contendo um anel γ -lactônico, geralmente α,β -insaturado e um, dois ou três anéis tetra-hidrofurânicos, que podem ser ou não adjacentes (SANTOS *et al.*, 1994). Embora uma relação estrutura-atividade não esteja totalmente esclarecida para as acetogeninas, a atividade leishmanicida tem sido atribuída ao número de grupos hidroxí ou à presença de um anel de tetra-hidrofurano único na sua estrutura (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001). Apresentam significativas atividades biológicas como antitumoral, antiparasitária, pesticida, antiprotozoários e antimicrobiana (ALALI *et al.*, 1999). A potência citotóxica encontrada para alguns destes compostos podem ser explicados pela inibição nas mitocôndrias da NADH ubiquinona oxidoreductase (DEGLI ESPOSTE *et al.*, 1994, ZAFRA-POLO *et al.*, 1996; GONZÁLEZ-COLOMA *et al.*, 2002).

O gênero *Annona* é constituído por 250 espécies encontradas no território brasileiro (SOUZA & LORENZI, 2008; MELLO-SILVA & PONTES, 2005). Análises fitoquímicas desse gênero revelaram a presença de diferentes classes de metabólitos ativos, como alcalóides isoquinolinínicos e pirimidina- β -carbolínicos (SILVA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2006), acetogeninas (YANG *et al.*, 2009), as lectinas (COELHO *et al.*, 2006) e óleos voláteis (FERREIRA *et al.*, 2009; BOYOM *et al.*, 1996) e relatam seu uso contra os protozoários responsáveis por doenças tropicais endêmicas. Estudos anteriores sobre as espécies do gênero *Annona* apresentam investigações biológicas sobre formas promastigotas de leishmania, por

exemplo, *A. coriacea* (SIQUEIRA *et al.*, 2010; TEMPONE *et al.*, 2005); *A. crassiflora* (MESQUITA *et al.*, 2005; TEMPONE *et al.*, 2005); *A. foetida* (COSTA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009); *A. glauca* (WAECHTER *et al.*, 1998); *A. impressivenia* (SANTOS *et al.*, 2006); *A. muricata* (BORIES *et al.*, 1991; JARAMILO *et al.*, 2000; OSORIO *et al.*, 2007; VILA NOVA *et al.*, 2008); *A. purpúrea* (CAMACHO *et al.*, 2003), *A. spinescens* (QUEIROZ *et al.*, 1996); *A. papilionella* (sinonímia *R. pittieri*) (OSÓRIO *et al.*, 2007); *A. exsucca* (sinonímia *R. exsucca*) (OSÓRIO *et al.*, 2007) e *A. emarginata* (sinonímia *R. emarginata*) (FÉVRIER *et al.*, 1999).

O gênero *Ephedranthus* é constituído por cinco espécies: *E. amazonicus*, *E. colombianus*, *E. guianensis*, *E. parviflorus*, *E. pisocarpus*. Não sendo observado relatos de investigações biológicas sobre atividade leishmanicida.

Apesar do aumento do número de estudos químicos e do potencial biológico das diferentes espécies de anonáceas, existem relativamente poucos relatos de investigações fitoquímicas e biológicas sobre a espécie *A. mucosa*, nenhum trabalho envolvendo a atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas foi descrita na literatura até a presente data, sendo os resultados obtidos inéditos abrindo perspectivas para aprimoramento dos estudos sobre extratos e substância isolada desta planta. A partir dessas análises, a espécie foi selecionada para pesquisas experimentais visando verificar o efeito leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c; o efeito citotóxico em macrófagos peritoneais murinos e o efeito no tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos BALB/c causada por *L. amazonensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AUTORIZAÇÕES PARA PESQUISA

Autorizações do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e recursos florestais não renováveis (IBAMA) e do Comitê do patrimônio Genético (CGEM), para coleta das espécies vegetais, extração dos óleos e bioprospecção (Apêndices 9.5 REGISTRO DE COLETA NO IBAMA).

O projeto “Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais amazônicas” foi aprovado e está registrado sob o nº 2011/1 na folha 8 do livro 1 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais (IPEPATRO/FIOCRUZ) para uso experimental com camundongos BALB/c (Apêndices 9.6 CERTIFICADO DO COMITÉ DE ÉTICA (CEUA/IPEPATRO)).

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras analisadas de *A. mucosa* nesse trabalho foram preparadas pelo aluno Antonio Marcos Guimarães dos Santos (PIB-E/079/2007) sob orientação da Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro. As folhas e sementes da espécie *A. mucosa* foram coletadas no dia 26 de setembro de 2007, no Setor Sul do Campus da UFAM - Manaus, sendo identificado pelo Dr. Antonio Carlos

Weber, do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFAM. A exsicata da espécie foi depositada no herbário da UFAM, sob os números 8148.

O material botânico seco e moído foi submetido à maceração com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e metanol. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório à pressão reduzida e secos em dessecador. Após a completa secagem os extratos foram pesados para a obtenção dos rendimentos. Foram preparados os seguintes extratos: extrato hexânico (EHF), diclometânico (EDF) e metanólico (EMF) das folhas, extratos hexânico (EHS) e metanólico (EMS) das sementes (Figura 19).

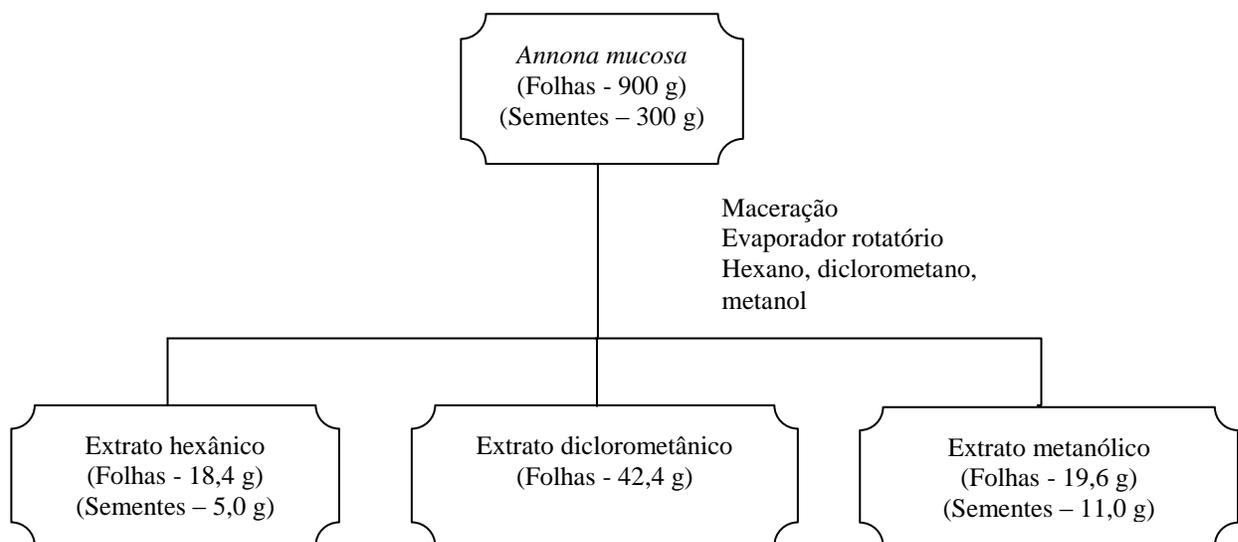


Figura 19 - Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas e sementes de *Annona mucosa*.

As amostras analisadas de *A. sericea* e *E. amazonicus* nesse trabalho foram preparadas pela aluna Danielle Cardoso de Alencar sob orientação da Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro. O material botânico, galhos finos (GF) e folhas (F), foram coletados no Campus Universitário da UFAM - Manaus, entre os meses de fevereiro a junho de 2009, sendo identificado pelo Dr.

Antonio Carlos Weber, do Departamento de Biologia do ICB da UFAM. A exsicata da espécie *A. sericea* foi depositada no herbário da UFAM, sob os números 8148. De acordo com Maas (2007), o período de floração de *E. amazonicus* é de março a maio e da frutificação, de maio a setembro. Esta espécie foi acompanhada durante o andamento da pesquisa, mas sua fertilização não pôde ser observada e por isso não teve ainda exsicata depositada no herbário.

O material coletado (500 g) foi seco, pulverizado e submetido a extração por maceração, sucessivamente, em hexano e metanol, por 3 dias em cada solvente. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório, à pressão reduzida, foram obtidos os extratos das folhas (F) e galhos finos (GF) das duas espécies os respectivos rendimentos, como segue: Extrato hexânico- *A. sericea*, F (5,520 g), GF (2,950 g); *E. amazonicus*, F (1,197 g), GF (0,405 g); Extrato metanólico- *A. sericea*, F (20,301 g), GF (4,002 g); *E. amazonicus*, F (6,096 g), GF (2,251 g). Os extratos metanólicos foram solubilizados em diclorometano e extraídos três vezes com solução de ácido clorídrico a 3% v/v, obtendo-se duas frações de cada extrato, a aquosa ácida e a fração diclorometânica neutra. A fração aquosa ácida foi basificada com hidróxido de amônio concentrado até pH 10 em seguida, foi extraída com diclorometano, levando a duas novas frações, a fração diclorometânica alcaloídica e a fração aquosa básica que foi desprezada. A evaporação do solvente da fração diclorometânica alcaloídica levou a obtenção de 0,150 g e 0,051 g, respectivamente, de fração alcaloídica das folhas e galhos finos da espécie *A. sericea* (Figura 20). Tratamento similar levou à obtenção de 0,174 g e 0,233 g de fração alcaloídica das F e GF de *E. amazonicus* (Figura 21).

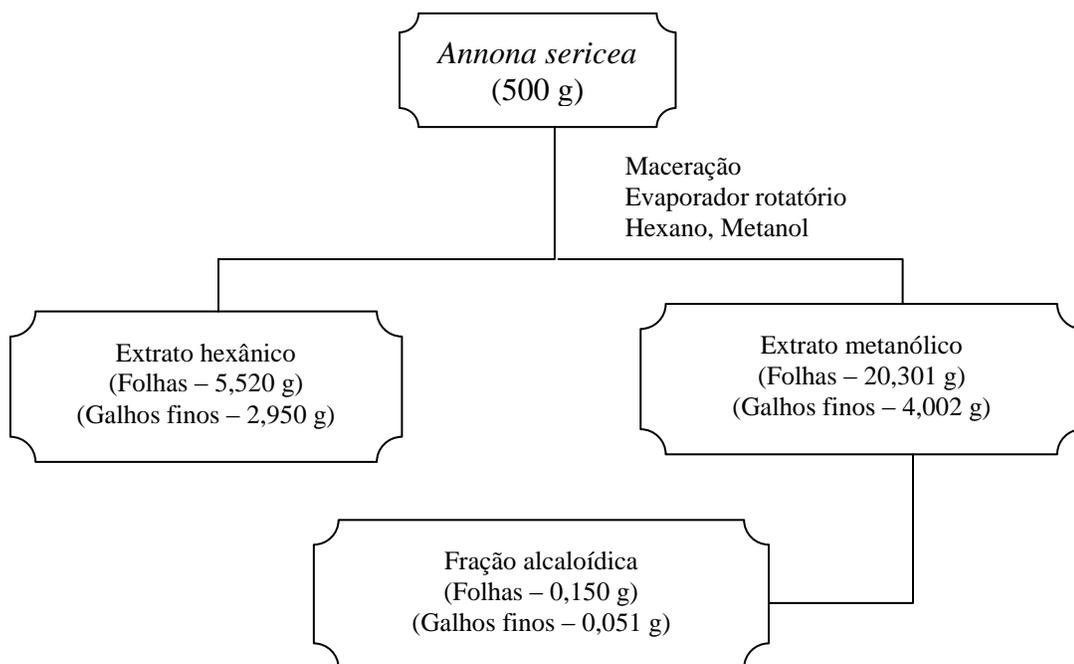


Figura 20 – Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas e galhos finos de *Annona sericea*.

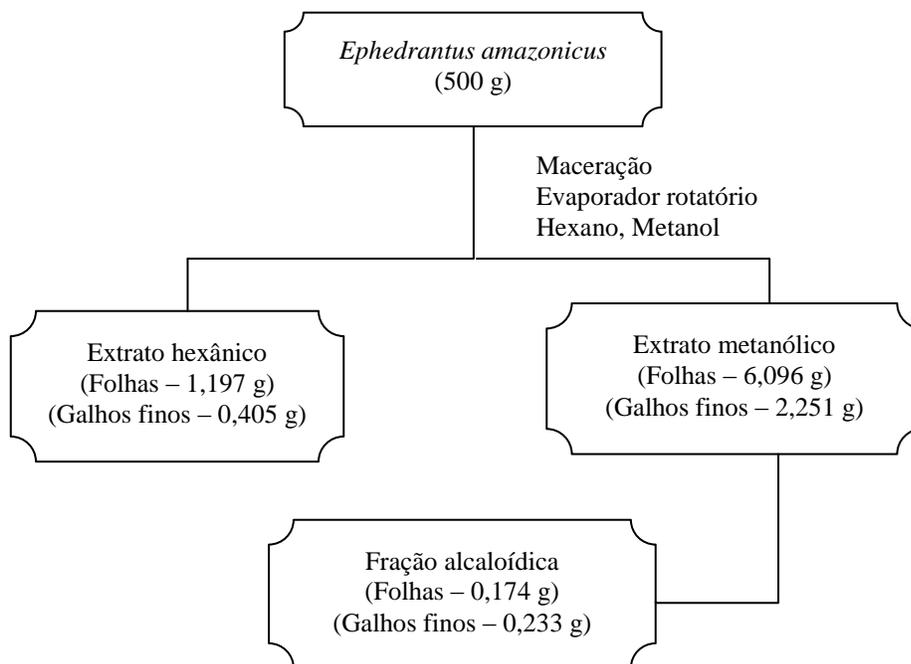


Figura 21 - Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas e galhos finos de *Ephedrantus amazonicus*.

4.2.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E MARCHA QUÍMICA PARA OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES

O extrato diclorometânico das folhas (EDF) (11.2 g) foi submetido à extração ácido-base de acordo com a metodologia descrita por Costa e colaboradores (2006). O EDF foi solubilizado em diclorometano e extraído três vezes com solução de ácido clorídrico a 3% v/v, obtendo-se duas frações: a fração aquosa ácida e a fração diclorometânica neutra. A fração aquosa ácida foi basificada a pH 9 com hidróxido de amônio concentrado, sendo extraído três vezes com diclorometano, levando a duas frações: a fração diclorometânica alcaloídica, concentrada a evaporador rotatório à pressão reduzida, e a fração aquosa sendo desprezada, (Figura 22).

A fração diclorometano alcaloídica foi submetido a uma coluna cromatográfica de gel sílica eluída com os sistemas de gradiente: hexano-diclorometano de 100:0 a 10:90, seguido por diclorometano-metanol a partir de 100:0 a 50:50, gerando 56 subfrações. As subfrações eluídas foram avaliadas e agrupadas de acordo com a análise de cromatografia em camada delgada (CCD), para dar 6 grupos de frações (GF1-GF6). GF3 (20,0 mg) foi purificado por CCD preparativa eluída com hexano-acetona (60:40, três vezes), originando 1 (2,0 mg) e 2 (8,0 mg), respectivamente.

Os compostos 1 e 2 foram identificados, através de técnicas espectrométricas (RMN ^1H e RMN ^{13}C), respectivamente como os alcalóides atherospermidina e lirioidenina (COSTA *et al.*, 2011), sendo o último, o principal constituinte do extrato em diclororometano das folhas desta espécie.

Tendo em vista pequeno rendimento de lirioidenina em *A. mucosa*, neste trabalho foi também utilizada amostra do alcalóide lirioidenina isolada de *A. impressivenia* (SANTOS, 2007),

por intermédio de marcha convencional para obtenção de alcalóides (COSTA *et al.*, 2006) para testes *in vitro*, do acervo de alcalóides do nosso grupo de pesquisa.

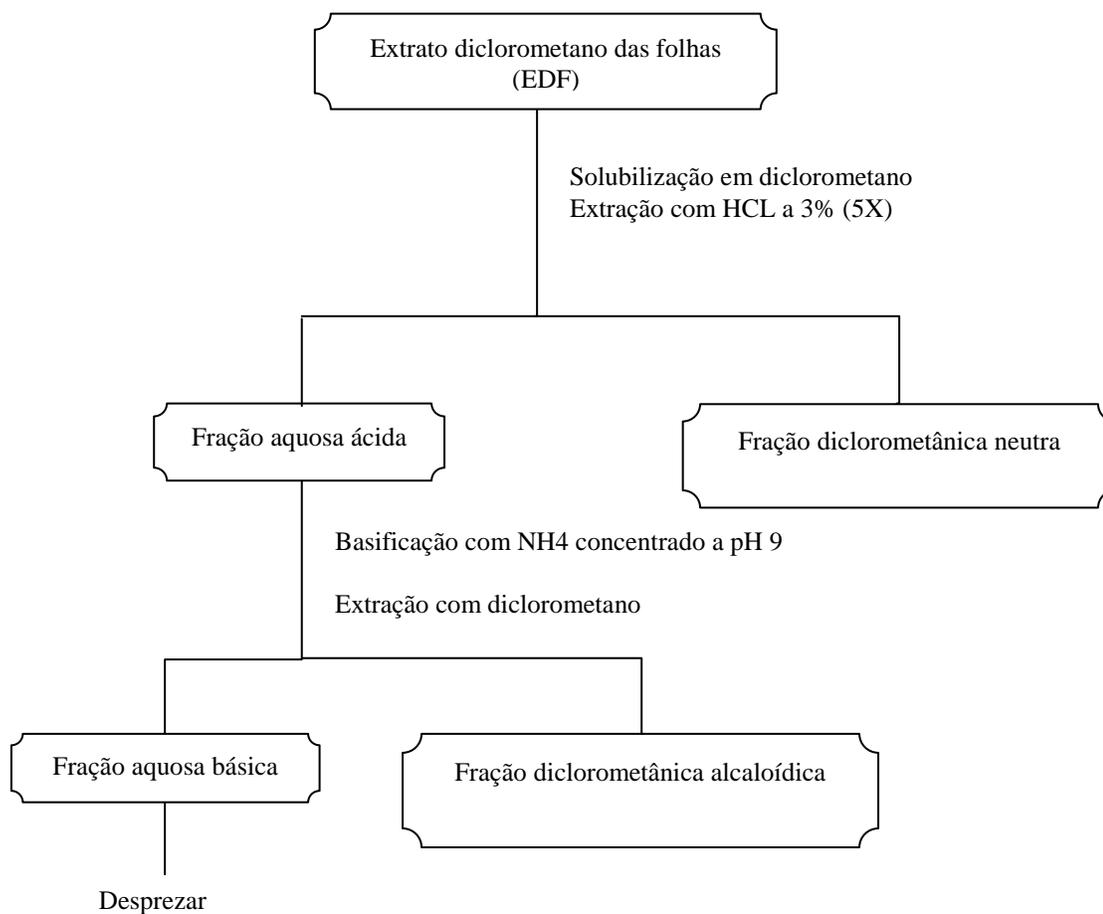


Figura 22 - Fluxograma da análise cromatográfica e marcha química aplicada ao extrato diclorometânico das folhas de *Annona mucosa*.

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.3.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* E *Leishmania guyanensis*

4.3.1.1 Parasitas

Os parasitas utilizados nesse trabalho foram formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* cepa M2903 (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* cepa M4147 (MHOM/BR/75/M4147) oriundas de culturas mantidas crio-preservedas no Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais (IPEPATRO), recém incorporado à FIOCRUZ Rondônia.

A cultura original da cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8) foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto - São Paulo; cepa M2903 (MHOM/BR/75/M2903) foi cedida pela Dr^a Maria Norma Melo, do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da UFMG de Belo Horizonte - Minas Gerais; cepa M4147 (MHOM/BR/75/M4147) foi cedida pela MsC Maricleide de Farias Naiff, do INPA de Manaus - Amazonas.

4.3.1.2 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* foi Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Foetal Bovine Serum, Gibco TM, Invitrogen, Brazil) previamente inativado a 56 °C por 30 min e somente

adicionado ao meio no momento do uso. O RPMI 1640 foi preparado reconstituindo-se o pó em 1 L de água destilada, adicionando 20 nM HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico; GIBCOBRL) e 50 µg/mL de gentamicina. Depois de preparado o meio RPMI 1640 procedeu-se a esterilização por filtração em membrana de poro 0,22 µm (Millipore). Esse meio também foi utilizado para os ensaios *in vitro* de macrófagos peritoneais descritos a seguir.

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. braziliensis* foi o *Schneider* para insetos (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de SFB previamente inativado a 56 °C por 30 min e somente adicionado ao meio no momento do uso.

4.3.1.3 Cultivo de parasita

Para a propagação *in vitro* das formas promastigotas utilizou-se culturas de 5° dia de crescimento (final da fase logarítma) lavadas duas vezes por centrifugação a 1000 *xg* por 10 min em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e ressuspensas em meio de cultura preparado como descrito no item anterior. Após contagem em câmara de Neubauer, 5×10^5 parasitas/mL foram ressuspensos em meio de cultura suplementado com SFB.

A manutenção das culturas de promastigotas ocorreu pelo repique a cada cinco dias, as mesmas foram incubadas a 24 °C. O crescimento dos parasitas foi avaliado por contagem como descrito a seguir.

4.3.1.4 Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*

A avaliação do crescimento dos parasitas foi realizada através de curvas de crescimento das promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* obtidas a partir de culturas em fase final de crescimento logarítmico. A cada 24 h, alíquotas das culturas foram diluídas em 1 mL de PBS gelado estéril sendo acrescentados 100 µL de corante Eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,04% (p/v). Após 5 min no gelo foi realizada a contagem diferencial das promastigotas em câmara hemocitométrica de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400X. A média aritmética de duas contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1mL de cultura (SILVA-JARDIM, 2001). Os dados obtidos foram analisados segundo a fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de parasitas} = \text{n}^\circ \text{ de parasitas contados} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

Avaliou-se a quantidade de promastigotas em material codificado por dois observadores independentes. Os parasitas corados em vermelho foram considerados mortos e os birrefringentes e móveis considerados vivos. Foram considerados para o cálculo apenas o número de parasitas vivos.

4.3.1.5 Calibração de controles

Previamente, a pentamidina (PENT) foi testada frente as formas promastigotas de *Leishmania* spp., as concentrações variaram de 6,0 a 100 µg/mL. O solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente dos produtos naturais também foi testado em diferentes

concentrações variando de 0,1 a 10%, até se encontrar uma concentração que não se ocasiona mortalidade das formas promastigotas.

Aa avaliações da viabilidade das promastigotas na presença de PENT e DMSO foram realizadas segundo o protocolo proposto por Fumarola e colaboradores (2004). Inicialmente, 5×10^5 promastigotas/mL de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, em início de fase estacionária de crescimento foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1000 *xg* por 10 min em PBS estéril, distribuídas em eppendorfs e incubadas por cinco dias a 24 °C com as diferentes concentrações das amostras. Para verificar o crescimento dos parasitas, diariamente, alíquotas da cultura foram diluídas em PBS gelado contendo o corante Eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,04% (p/v). Realizou-se a contagem dos parasitas em câmara hemocitométrica de Neubauer. Todos os ensaios foram realizados seis vezes em duplicatas.

4.3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*, *L. braziliensis* E *L. guyanensis* APÓS EXPOSIÇÃO ÀS AMOSTRAS

A avaliação da viabilidade das promastigotas na presença das amostras foi realizada segundo o protocolo proposto por Fumarola e colaboradores (2004). Inicialmente, 5×10^5 promastigotas/mL de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, em início de fase estacionária de crescimento foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1000 *xg* por 10 min em PBS estéril, distribuídas em eppendorfs e incubadas por cinco dias a 24 °C com diferentes concentrações das amostras (Quadro 1).

Culturas não tratadas e tratadas com PENT e com solvente DMSO a 0,7% foram utilizadas como controle. Em todos os experimentos, para verificar o crescimento dos parasitas,

diariamente, alíquotas da cultura foram diluídas em PBS gelado contendo o corante Eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,04% (p/v). Realizou-se a contagem dos parasitas em câmara hemocitométrica de Neubauer.

Quadro 1 - Concentração das amostras frente a formas promastigotas.

Nome Botânico	Amostra	Código	Parte da planta	Concentração (µg/mL)
<i>Annona mucosa</i>	Liriodenina	LIRIO	Folhas	100, 50, 25, 12 e 6
	Extrato diclorometano	EDF	Folhas	
	Extrato hexânico	EHF	Folhas	
	Extrato metanólico	EMF	Folhas	
	Extrato hexânico	EHS	Sementes	
	Extrato metanólico	EMS	Sementes	
<i>Annona sericea</i>	Fração Alcaloídica	FALASF	Folhas	
		FALASGF	Galhos Finos	
	Extrato hexânico	EHGFAS	Galhos Finos	
	Extrato metanólico	EMGFAS	Galhos Finos	
<i>Ephedranthus amazonicus</i>	Fração Alcaloídica	FALEAF	Folhas	
		FALEAGF	Galhos Finos	
Pentamidina ^a		PENT		50
Dimetilsulfóxido ^b		DMSO		50

^a Droga referência.

^b Promotor de solubilidade.

Todos os ensaios foram realizados seis vezes em duplicatas. Os resultados são expressos em 50% de Concentração Inibitória (CI₅₀), baseado em Schmeda-Hirschman e colaboradores (1996) e Camacho e colaboradores (2003).

4.3.3 OBTENÇÃO, TOXICIDADE E INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS

4.3.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos BALB/c adultos entre 8 e 10 semanas de idade, cedidos pelo biotério do Instituto de Patologias Tropicais (IPEPATRO/FIOCRUZ).

4.3.3.2 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos

Os macrófagos foram selecionados por serem os responsáveis pela fase efetora da imunidade adquirida, além de serem as principais células ativas na fagocitose das leishmânias (CUNNINGHAM, 2002). Conforme protocolo proposto para obtenção de macrófagos, camundongos BALB/c foram inoculados via intraperitoneal com 2 mL de uma solução estéril de tioglicolato 3%. Após quatro dias, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e 5mL de meio RPMI 1640 gelado foi inoculado na cavidade peritoneal (GORDON *et al.*, 1974).

O RPMI 1640 foi recolhido da cavidade peritoneal e centrifugado a 800 \times g por 10 min a 4 °C. As células obtidas foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, plaqueadas e incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

4.3.3.3 Teste de viabilidade celular

O teste de citotoxicidade permite uma análise comparativa fácil em relação às reações das células *in vitro* ao extrato ou composto em teste e os benefícios/malefícios trazidos por eles; isso permite que se estabeleça a viabilidade e/ou a necessidade de testes com animais, e também permite que se estabeleçam níveis de segurança para a realização desses testes, caso sejam considerados convenientes (SEGNER, 1994). Os extratos orgânicos da espécie *A. mucosa* e o alcalóide liriodenina foram selecionados para avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*, com a finalidade de aprofundar-se nos conhecimentos sobre os efeitos dos extratos como moduladores da resposta biológica.

A avaliação da viabilidade das células hospedeiras foi realizada segundo a técnica de coloração com azul de Tripán. A coloração com azul de Tripán avalia a integridade da membrana

celular e cora de azul o citoplasma das células mortas, permitindo diferenciá-las das células vivas que não adquirem a coloração (CARVALHO *et al.*, 2004; VALADARES *et al.*, 2008). Dessa forma são estabelecidos os parâmetros de viabilidade celular das substâncias sobre a cultura de células analisadas. As células são então contadas e são determinados os parâmetros estatísticos necessários para que se estabeleçam as diretrizes quantitativas da citotoxicidade do material sobre a cultura (SILVA *et al.*, 2004).

Os macrófagos foram ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 completo, de modo a obter 1×10^5 células/mL. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, tratadas com as amostras (Quadro 2) e incubadas em estufa a 37 °C, atmosfera úmida a 5% de CO₂.

A citotoxicidade da PENT e do DMSO foram avaliadas frente a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, A Pent e o DMSO foram avaliadas em cinco concentrações diferentes. O controle para determinar a viabilidade celular foram culturas sem tratamento e tratadas com PENT e com DMSO a 0,7%.

Quadro 2 - Concentração das amostras na avaliação da viabilidade celular.

Nome Botânico	Amostra	Código	Parte da planta	Concentração (µg/mL)
<i>Annona mucosa</i>	Liriodenina	LIRI	Folhas	100, 50, 25, 12 e 6
	Extrato diclorometano	EDF	Folhas	
	Extrato hexânico	EHF	Folhas	
	Extrato metanólico	EMF	Folhas	
	Extrato hexânico	EHS	Sementes	
	Extrato metanólico	EMS	Sementes	
Pentamidina ^a		PENT		50
Dimetilsulfóxido ^b		DMSO		50

^a Droga referência.

^b Promotor de solubilidade.

Após 24, 48 e 96 h de incubação, foi adicionado 20 µL de solução de azul de Tripán (0,1%) e realizou-se a contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer. O índice

de viabilidade foi determinado pela contagem total de 100 células ao microscópio óptico, aumento de 400X, as células coradas em azul foram consideradas mortas e as birrefringentes consideradas vivas. Os resultados são expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células.

Todos os ensaios foram realizados três vezes em duplicata. Os resultados são expressos em 50% de Concentração Letal (CL_{50}), baseado em Schmeda-Hirschman e colaboradores (1996) e Camacho e colaboradores (2003).

4.3.4 CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA

As amostras testadas para a atividade leishmanicida foram desafiadas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* e formas amastigotas de *L. amazonensis*. A atividade leishmanicida de cada amostra é representada por 50% de Concentração Inibitória (CI_{50}); classificou-se as amostras como altamente ativa ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), ativo ($10 \mu\text{g/mL} < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativo ($50 \mu\text{g/mL} < CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) e não-ativo ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (OSÓRIO *et al.*, 2007).

A atividade citotóxica frente a células de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c é representada por 50% de Concentração Letal (CL_{50}); classificou-se as amostras como altamente tóxico ($CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), tóxico ($10 \mu\text{g/mL} < CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), moderadamente tóxico ($100 \mu\text{g/mL} < CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$) e potencialmente não tóxico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) (OSÓRIO *et al.*, 2007).

Os cálculos de CI_{50} foram realizados utilizando modelo de regressão não-linear através da curva dose-resposta de inibição (Log [inibidor] x resposta), descrevendo a relação existente entre

as várias concentrações das amostras e o número de leishmania obtidos nas curvas de crescimento. Com o mesmo princípio, os cálculos de CL_{50} descrevem a relação existente entre as várias concentrações das amostras e o viabilidade celular dos macrófagos.

As amostras foram avaliadas por determinação do seu Índice de seletividade (IS). O cálculo é realizado utilizando a fórmula: Índice de seletividade = CL_{50}/CI_{50} . Ao avaliar a seletividade de ação leishmanicida versus citotoxicidade, pode ser visto que valores menores que 1 indicam que a amostra é mais tóxica para os macrófagos do que para os protozoários. Em contrapartida, valores superiores a 1 indicam que a amostra é mais seletiva contra os parasitas do que contra os macrófagos (CAMACHO *et al.*, 2003).

4.3.5 INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS COM PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

O sucesso da infecção e propagação do patógeno depende da interação da leishmania com o macrófago em condições ideais para o estabelecimento da infecção; além do impedimento da resposta imunológica e da destruição da maquinaria da célula hospedeira (HENRIQUE & SOUZA, 2000). A infecção de macrófagos com *L. amazonensis* utilizando uma razão de dez parasitos por célula resulta em taxas de infecção $\geq 50\%$ mesmo após 48 h, com um grande número de amastigotas intracelulares, possivelmente devido a características de infectividade diferenciada desta espécie de *Leishmania* (CHANG, 1980).

Para a avaliação da atividade das amostras na sobrevivência de *L. amazonensis* na célula hospedeira, macrófagos peritoneais foram coletados como descrito no item 4.3.3.2 e utilizados para os ensaios de infecção, de modo a obter 5×10^5 células, em 500 μ L de meio de cultura

RPMI completo. As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro estéreis em placas 24 poços, por 24 h a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO₂. Em seguida, os poços foram lavados uma vez com PBS estéril para a remoção de células não aderidas. Os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na taxa de 10 parasitas para 1 macrófago.

As células infectadas foram incubadas por 24 h a 34 °C em atmosfera a 5% de CO₂. Após esse período, os poços foram novamente lavados com PBS estéril. Em seguida, foi adicionado nos poços 500 µL de meio de cultura, contendo as amostras (Quadro 3), a cultura foi mantida por 24, 48 e 96 h a 34 °C na presença de 5% de CO₂.

As lâminas com macrófagos infectados de cada amostra foram coradas pela técnica May Grünwald-Giemsa (GIAIMIS *et al.*, 1992). Resumidamente, as células foram lavadas com meio de cultura e imobilizadas na lamínula com SFB até secar. Depois de secas, o corante May-Grüwald foi adicionado sobre as lamínulas por 20 segundos e em seguida foi adicionada água destilada. Remove-se o corante e acrescenta-se o corante Giemsa, por 1 min, sendo preparado no momento do uso pela adição de uma gota do corante para cada mL de água destilada. Finalmente, a lamínula foi lavada rapidamente com água destilada e depois de seca foi fixada com bálsamo sobre uma lâmina.

Quadro 3 - Concentração das amostras na infecção dos macrófagos.

Nome Botânico	Amostra	Código	Parte da planta	Concentração (µg/mL)
	Liriodenina	LIRIO	Folhas	25
<i>Annona mucosa</i>	Extrato diclorometano	EDF	Folhas	25
	Extrato hexânico	EHF	Folhas	12
	Extrato metanólico	EMF	Folhas	25
	Extrato hexânico	EHS	Sementes	25
	Extrato metanólico	EMS	Sementes	25
Pentamidina ^a		PENT		25
Dimetilsulfóxido ^b		DMSO		25

^a Droga referência.

^b Promotor de solubilidade.

Em virtude das características intrínsecas das cepas, a proporção de parasitos/célula no momento da infecção necessita ser ajustada para que as taxas de infecção e o número de parasitas por célula sejam adequados para a análise (CHANG, 1980). A taxa de infecção celular deverá estar ao redor de 30 - 60% e o número de parasitas por células não deve ser excessivamente grande. O excesso de parasitos torna a avaliação laboriosa ao passo que uma taxa de infecção muito reduzida torna difícil a observação do efeito antiparasitário do composto testado (SILVA, 2008).

O método descrito por Fumorola e colaboradores (2004) para avaliação da atividade dos extratos em formas amastigotas intracelulares de macrófagos infectados por *L. amazonensis* foi utilizado, examinando-se 200 macrófagos de cada amostra em microscópio óptico no aumento de 1000X. Os macrófagos com membrana celular arrebatada não foram considerados na contagem, sendo realizada apenas com macrófagos intactos.

Todos os ensaios foram realizados três vezes em duplicata. Os resultados são expressos em percentagem de macrófagos infectados (taxa de infecção) e percentagem de amastigotas/macrófago em comparação com o controle (TORRES-SANTOS, 1999; MONZOTE, 2010).

4.3.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A técnica utilizada para a análise da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelas células infectadas foi descrita por Pick & Keisari (1980), e adaptada para microensaio por Pick & Mizel (1981), com modificações propostas por Russo e colaboradores (1989). A produção do

H_2O_2 é quantificada no sobrenadante das culturas dos macrófagos peritoneais, após 1 h de incubação, pela microtécnica de oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase. O princípio da técnica fundamenta-se na oxidação da fenolsulftaleína (vermelho de fenol) pela peroxidase na presença de H_2O_2 formando um produto que pode ser lido por colorimetria.

Macrófagos peritoneais coletados como descrito no item 4.3.3.2, de modo a obter 1×10^5 células, em 200 μ L de meio de cultura RPMI incompleto foram adicionados em placas de 96 poços (Costar 3524, Corning, USA) de fundo chato. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO_2 . Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril para a remoção de células não aderidas, após foram incubadas na presença ou não de 20 nM de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma) e na presença de uma solução de vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3 correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL (Sigma), por 1 h a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO_2 . Após incubação interrompeu-se a reação com 10 μ L de hidróxido de sódio 1N (NaOH) e em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placa (Biorad) com filtro de 590 nm. Todos os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata. Os dados foram confrontados com uma curva padrão de peróxido de hidrogênio (descrito no item 4.3.6.1). Os resultados são expressos em μ M de H_2O_2 .

4.3.6.1 Curva - padrão de peróxido de hidrogênio

A curva-padrão utilizada para determinação de H_2O_2 foi elaborada a partir da diluição seriada de uma solução estoque de H_2O_2 (Sigma) de concentração 10 mM nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, respectivamente, 100; 50; 25; 12,5 e 1,56 μ M, com vermelho de fenol acrescido de peroxidase, correspondente a 19 unidades de purpurogalina/mL.

O padrão 0 μM foi preparado com vermelho de fenol sem peroxidase. A curva foi distribuída em triplicata em placa de 96 poços, logo após 96 horas de tratamento e anteriormente ao acréscimo de NaOH 1N.

4.3.6.2 Padronização da dose ótima de acetato forbol miristato (PMA)

A dose ótima de PMA utilizada para determinação de H_2O_2 foi identificada através da curva dose – resposta. Macrófagos peritoneais coletados como descrito no item 4.3.3.2, de modo a obter 1×10^5 células, em 200 μL de meio de cultura RPMI incompleto foram adicionados em placas de 96 poços (Costar 3524, Corning, USA) de fundo chato. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO_2 . Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS estéril para a remoção de células não aderidas, após foram incubadas na presença ou ausência de PMA nas seguintes concentrações: 0,2; 10; 20; 40; 80; 200 e 2000 nM, e na presença de uma solução de vermelho de fenol a 1% e peroxidase tipo 1 RZ 1.3 correspondendo a 19 unidades de purpurogalina/mL (Sigma), por 1 h a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO_2 . Após incubação interrompeu-se a reação com 10 μL de hidróxido de sódio 1N (NaOH) e em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placa (Biorad) com filtro de 590 nm. Todos os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata. Os resultados da produção de H_2O_2 são expressos em densidade óptica (DO). A solução de vermelho de fenol foram preparada utilizando 19 unidades de purpurogalina/mL e a curva padrão conforme descrito no item 4.3.5.1.

Os sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais após estímulo com PMA na concentração de 20 e 80 nM apresentaram respostas satisfatórias. As concentrações de 40; 200 e 2000 nM apresentaram médias de estímulo baixas, como o estímulo de 80 nM está entre essas,

padronizou-se utilizar 20 nM de PMA por poço nos experimentos para determinação da produção de H₂O₂ (Tabela 1).

Tabela 1 – Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais após estímulo com PMA.

Estímulo com PMA (nM)	Média + SD ^a da DO ^b
0,2	0,307 ± 0,010
10	0,311 ± 0,005
20	0,343 ± 0,001
40	0,276 ± 0,032
80	0,341 ± 0,001
200	0,338 ± 0,001
2000	0,335 ± 0,009

^a Desvio padrão.

^b Densidade óptica.

4.3.7 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS INFECTADOS

A produção de NO é medida pela dosagem dos seus produtos de transformação mais estáveis, ou seja, o acúmulo de nitrito (NO₂⁻) no sobrenadante da cultura celular dos macrófagos tratados e não tratados, infectados ou não com *L. amazonensis*. O ensaio foi analisado através do reagente de Griess que indica a produção de NO (GREEN *et al.*, 1982).

Neste método, o NO₂⁻ primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro.

Macrófagos peritoneais foram coletados como descrito no item 4.3.3.2 e os sobrenadantes das culturas tratadas e não tratadas do item 4.3.3.4, de modo a obter 2 x 10⁵ células, em 200 µL de meio de cultura RPMI foram adicionados em placas de 96 poços (Costar 3524, Corning, USA) de fundo chato. Depois de adicionados incubaram-se as placas por 24, 48 e 96 h com ou sem 10

ng/mL lipopolissacarídeo (LPS) ou com 10 ng/mL de interferon- γ (INF- γ) ou com ambos, em um volume final de 200 μ L de RPMI completo.

Após 24, 48 e 96 h de incubação, a placa foi centrifugada a 200 $\times g$ por 10 min. Em 100 μ L do sobrenadante foram adicionados 100 μ L do reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido a 0,1%, sulfanilamida a 1% e H_3PO_4 a 2,5%). Os controles de produção de NO, foram células não-infectadas e infectadas tratadas apenas com LPS e INF- γ . As concentrações de NO_2^- nos sobrenadantes das culturas foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$). Após 5 min a leitura da reação foi realizada por espectrofotômetro de placa (Biorad) em comprimento de onda de 540nm.

Todos os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata. Os resultados são expressos em μ M de NO_2^- .

4.3.7.1 Curva - padrão de óxido nítrico

A curva-padrão utilizada para determinação de NO foi elaborada a partir da diluição seriada de uma solução estoque de nitrito de sódio ($NaNO_2$) de concentração 10 mM nas concentrações de 60, 30, 10 e 5 μ M, com água destilada. O padrão 0 μ M foi preparado com água destilada.

4.3.7.2 Padronização da dose ótima de lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (INF- γ)

A dose ótima de INF- γ e do LPS utilizada para determinação de NO, foi identificada através da curva dose – resposta. Macrófagos peritoneais coletados como descrito no item

4.3.3.2, de modo a obter 1×10^5 células, em 200 μL de meio de cultura RPMI incompleto e foram adicionadas em placas de 96 poços (Costar 3524, Corning, USA) de fundo chato. Estas foram incubadas por 24 h a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO_2 , na ausência ou na presença de LPS (5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e/ou $\text{INF-}\gamma$ (1, 5, 10 e 20 ng/mL). A produção do NO foi analisada como descrito no item 4.3.4. Todos os ensaios foram realizados duas vezes em triplicata. Os resultados da produção de NO no sobrenadante das culturas são expressos em DO.

Os sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais apresentaram após estímulo com as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS e 5 e 10 ng/mL de $\text{INF-}\gamma$ apresentaram médias de estímulos altas. Então se procederam a análises com estímulos de LPS e $\text{INF-}\gamma$ simultaneamente. Os resultados com estímulos com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS e 10 ng/mL de $\text{INF-}\gamma$ apresentaram respostas satisfatórias. Sendo assim, padronizou-se utilizar estas concentrações nos experimentos para determinação da produção de NO (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção de óxido nítrico por macrófagos após estímulo com LPS e $\text{INF-}\gamma$

Estímulo com LPS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Média + SD^a da DO^b
5	598 ± 13
10	591 ± 24
20	567 ± 6
Estímulo com $\text{INF-}\gamma$ (ng/mL)	
1	571 ± 10
5	594 ± 6
10	594 ± 0
20	585 ± 5
Estímulo com LPS ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e $\text{INF-}\gamma$ (ng/mL)	
5 e 5	622 ± 9
10 e 5	599 ± 8
5 e 10	598 ± 6
10 e 10	620 ± 5

^a Desvio padrão.

^b Densidade óptica.

4.3.8 AVALIAÇÃO DE LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/c CAUSADAS POR *L. amazonensis* PRÉ E APÓS TRATAMENTO

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada para examinar aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasito-macrófago (HANDMAN *et al.*, 1979; SCOTT & FARRELL, 1998).

4.3.8.1 Formulação da pomada

As propriedades leishmanicida frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* determinadas nos testes *in vitro* auxiliaram no direcionamento da seleção dos extratos, e da concentração de incorporação a pomada, utilizando como veículo o creme lanette. Os extratos vegetais EDF e EHF foram incorporados ao creme lanette, o EDF na proporção de 25 $\mu\text{g/g}$ de lanette e o EHF na proporção de 12 $\mu\text{g/g}$ de lanette (Figura 23).



Figura 23 – Pomadas formuladas a base de extrato diclorometano e hexânico das folhas de *Annona mucosa*.

O creme lanette é um creme aniônico com composição de alcoóis graxos superiores e alquil sulfato, hidratante e emoliente, de baixa oleosidade, toque suave à alta resistência aos

princípios ativos que requerem veículos com este caráter. É compatível com todos cosméticos e fármacos que toleram emulsões aniônicas, sendo utilizado como veículo de princípios ativos terapêuticos, podendo ser incorporado óleos e extratos vegetais. Composição: ceras auto-emulsionantes, propilenoglicol, triglicérides do ácido cáprico, metilparabenos, propilparabenos, imidazolidinil uréia, dimeticone, BHT, EDTA dissódico e água deionizada (FB, 2010).

4.3.8.2 Infecção de camundongos BALB/c com promastigotas de *L. amazonensis*

Foram utilizados 80 Camundongos BALB/c, adultos entre 8 e 10 semanas, com peso individual variando entre 24 e 26 g, provenientes do biotério do IPEPATRO/FIOCRUZ, mantidos em ambiente controlado com água e ração oferecidos à vontade durante todo o experimento. Os camundongos BALB/c foram inoculados no coxim plantar traseiro direito com 1×10^6 parasitas/mL de formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase final de crescimento logarítmico.

4.3.8.3 Tratamento de leishmaniose cutânea experimental em camundongos BALB/c causada por *L. amazonensis*

O acompanhamento dos animais objetivou registrar o aparecimento, bem como o desenvolvimento das lesões cutâneas. O tratamento das lesões foi iniciado cinco semanas após a infecção. O experimento constou de dois ensaios, utilizando quatro animais por grupo experimental divididos de forma aleatória (Figura 24):

1. Grupo 1: Controle sem tratamento.

2. Grupo 2: Controle com lanette, animais tratados diariamente com aplicação tópica de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.
3. Grupo 3: Controle pentamidina, animais tratados em dias alternados com inoculação intraperitoneal de 4 mg/Kg/dia de pentamidina.
4. Grupo 4: Controle glucantime, animais tratados diariamente com inoculação intraperitoneal de 100 mg/Kg/dia de glucantime.
5. Grupo 5: Pomada formulada a base de EDF, tratados diariamente com aplicação tópica de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.
6. Grupo 6: Pomada formulada a base de EHF, tratados diariamente com aplicação tópica de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.
7. Grupo 7: Solução de EDF, animais tratados em dias alternados com inoculação intraperitoneal, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
8. Grupo 8: Solução de EHF, animais tratados em dias alternados com inoculação intraperitoneal, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
9. Grupo 9: Controle com solução de EDF – animais sadios tratados em dias alternados com inoculação intraperitoneal, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
10. Grupo 10: Controle com solução de EHF – animais sadios tratados em dias alternados com inoculação intraperitoneal, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tendo em vista as características da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c foram utilizados como controles glucantime (primeira escolha) e pentamidina (segunda escolha). O glucantime é indicado para o tratamento de todas as formas clínicas da LTA, não havendo resposta satisfatória com o tratamento inicia-se o tratamento com droga de segunda

escolha (MS, 2007). A avaliação da toxicidade *in vivo* dos extratos ocorreu através do tratamento com solução intraperitoneal em dias alternados de camundongos BALB/c não infectados.



Figura 24 – Distribuição dos grupos experimentais de camundongos BALB/c.

Os animais foram avaliados por critérios clínicos e parasitológicos. O critério clínico consistiu mensuração do peso vivo e da medição da lesão cutânea pré e pós-tratamento, e o critério parasitológico procedeu-se pela determinação da carga parasitária das lesões pelo método de diluição limitante duas semanas pós-tratamento. O estado clínico geral dos camundongos foi monitorado semanalmente a fim de avaliar alterações no metabolismo geral do organismo. Os aspectos analisados foram, portanto, peso dos animais, características do desenvolvimento da lesão e carga parasitária, objetivando identificar possível toxicidade dos extratos sobre esses parâmetros.

4.3.8.4 Acompanhamento do peso vivo

A avaliação da influência dos tratamentos sobre a evolução do peso vivo (kg) dos camundongos BALB/c foi iniciada no primeiro dia da infecção até o dia da eutanásia. O peso de

cada animal foi aferido sempre no mesmo horário, na mesma balança uma vez por semana. Para analisar a perda de peso em relação ao dia da infecção, aplicou-se o cálculo da variação percentual de peso expressa pelo peso final (pf) menos peso inicial (pi) dividido pelo peso inicial:

$$\Delta\% = (pf - pi)/pi.$$

4.3.8.5 Acompanhamento da lesão cutânea

O desenvolvimento da lesão foi determinado pela medida do diâmetro das patas com o auxílio de um paquímetro digital, com precisão de décimos de milímetro. O procedimento consistiu da medição do coxim plantar direito e esquerdo uma vez por semana, por até duas semanas após o término do tratamento (Figura 25). Após as duas semanas, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical com remoção das lesões em condições de esterilidade.

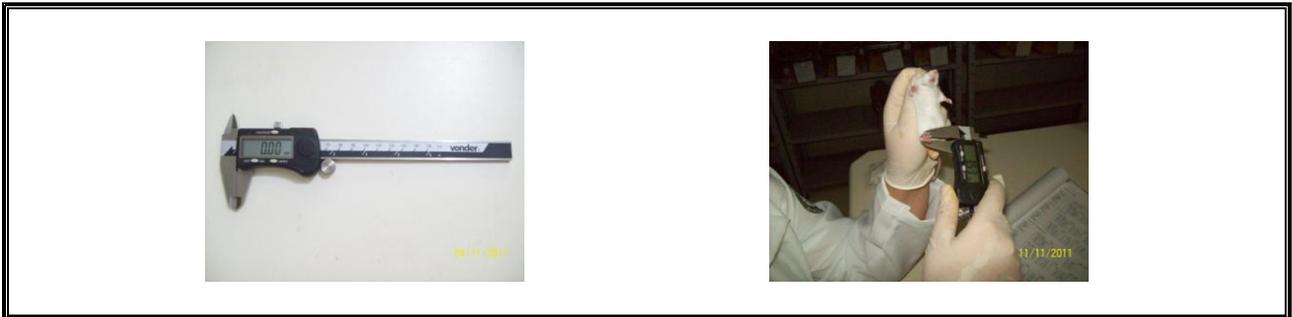


Figura 25 – Medição da lesão cutânea.

4.3.8.6 Quantificação da carga parasitária

As patas infectadas (coxim plantar direito) de dois camundongos por grupo de tratamento foram submetidas à técnica de diluição limitante (LDA - *limiting dilution assay*) para

quantificação de parasitas. O método estima o número aproximado de formas amastigotas viáveis nas patas infectadas (LIMA *et al.*, 1997).

A obtenção de formas amastigotas foi realizada pela maceração das patas em meio Schneider (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de SFB. A solução resultante (300µL) foi cultivada em placa de 96 poços (Costar 3524, Corning, USA) com diluição em série de 10 vezes. Estas foram incubadas por 10 dias a 26 °C na presença de 5% de CO₂. Após o período de incubação a leitura para observar a presença (+) ou ausência (-) de parasitas em cada poço foi realizada em microscópio de luz invertida com objetiva de 40X.

4.3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada no programa Graph Pad Prism 5.0 pelos métodos tradicionais de análise de variância (ANOVA) e de comparação de médias.

Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram efetuadas através da diferença entre as médias do número de promastigotas/dia nas diferentes concentrações de uma mesma droga em relação aos controles pela ANOVA de um fator, utilizando o teste de Student-Newman-Keuls, para cada espécie de *Leishmania*.

Nas análises de viabilidade celular das espécies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram efetuadas através da diferença entre as médias do número de macrófagos nas diferentes concentrações de uma mesma droga em relação aos controles pela ANOVA de um fator, utilizando o teste de Student-Newman-Keuls, para cada espécie de *Leishmania*.

As análises das formas amastigotas de *L. amazonensis* foram efetuadas através da diferença entre as médias dos números de amastigotas/célula nas diferentes concentrações de uma

mesma droga em relação aos controles em diferentes tempos pela ANOVA de dois fatores. O mesmo teste analisou a diferença entre as médias da taxa de infecção nas diferentes concentrações de uma mesma droga em relação aos controles em diferentes tempos.

No teste *in vivo* as análises foram realizadas através da diferença entre as médias dos diâmetros das patas, variação de peso e carga parasitária para cada grupo confrontando as situações de pré e pós-tratamento, pela ANOVA de um fator, utilizando o teste de Student-Newman-Keuls. O mesmo teste analisou a diferença entre o diâmetro das patas, variação de peso e carga parasitária nos diferentes tratamentos em relação aos controles em diferentes tempos.

5. RESULTADOS

5.1 CURVAS PADRÃO DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* apresentaram a fase exponencial tardia e a fase estacionária respectivamente, no sexto e sétimo dia de cultivo (Gráfico 1). Observou-se que estatisticamente não haveria diferença na escolha do quinto, sexto ou sétimo dia de crescimento. O sexto dia de crescimento definiu-se como o dia padrão de uso da cepa para os estudos *in vitro* e *in vivo* de *L. amazonensis* e estudos *in vitro* de *L. guyanensis*.

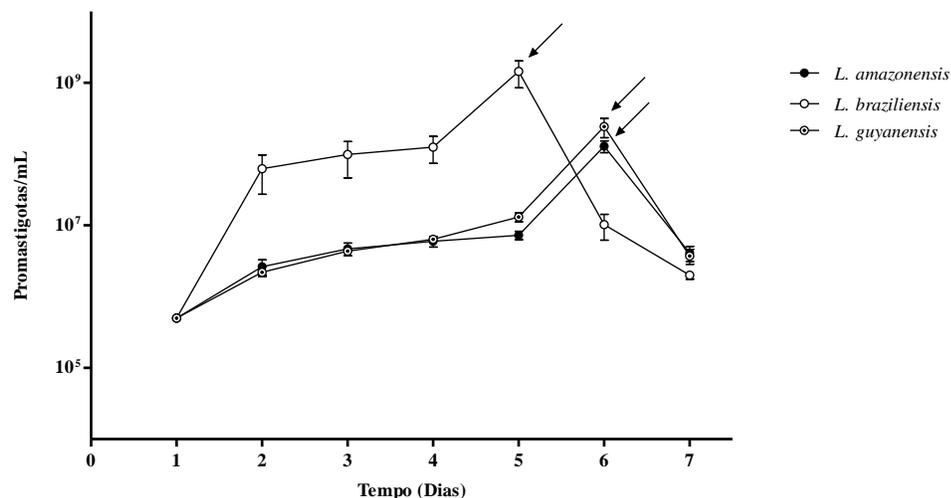


Gráfico 1 - Curva de crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). As setas indicadas na figura representam o dia escolhido para a coleta dos parasitas para a realização dos experimentos.

As formas promastigotas de *L. braziliensis* apresentaram a fase exponencial tardia no quinto dia de cultivo e a fase estacionária no sexto dia (Gráfico 1). Na análise estatística da curva observou-se que não haveria diferença na escolha do quinto, sexto ou sétimo dia de crescimento. Nos testes *in vitro* definiu-se o quinto dia como o padrão de uso da cepa para os estudos *in vitro* de *L. braziliensis*.

5.2 CALIBRAÇÃO DE CONTROLES

O solvente dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,7%, concentração semelhante à usada para as drogas na concentração de 50 µg/mL, não interfere na mortalidade das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2903 (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* cepa M4147 nos experimentos *in vitro*. As curvas de crescimento de *L. amazonensis* ($F = 4,902$; $P < 0,05$) e *L. guyanensis* ($F = 3,445$; $P < 0,05$) apresentam diferença significativa no crescimento parasitário entre o grupo controle não tratado e os grupos tratados com concentrações de 10, 5 e 2,5%. A curva de crescimento *L. braziliensis* apresenta diferença significativa ($F = 4,327$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário entre o grupo controle não tratado e os grupos tratados com concentrações de 10; 5; 2,5 e 1% (Gráfico 2C).

A utilização de 0,7% de DMSO nos bioensaios não interfere na viabilidade celular. Analisando os tempos de 24 ($F = 5,414$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$) e 48 ($F = 1,102$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) h de incubação observam-se diferenças significativas na viabilidade celular quando comparados o grupo controle e os grupos tratados com concentrações de 1; 0,7 e 0,5%. No tempo de 96 h de incubação observam-se diferenças significativas ($F = 1,265$; $P < 0,0001$; $P <$

0,001) na viabilidade celular quando comparados o grupo controle e os grupos tratados com todas as concentrações analisadas de DMSO (Gráfico 2D).

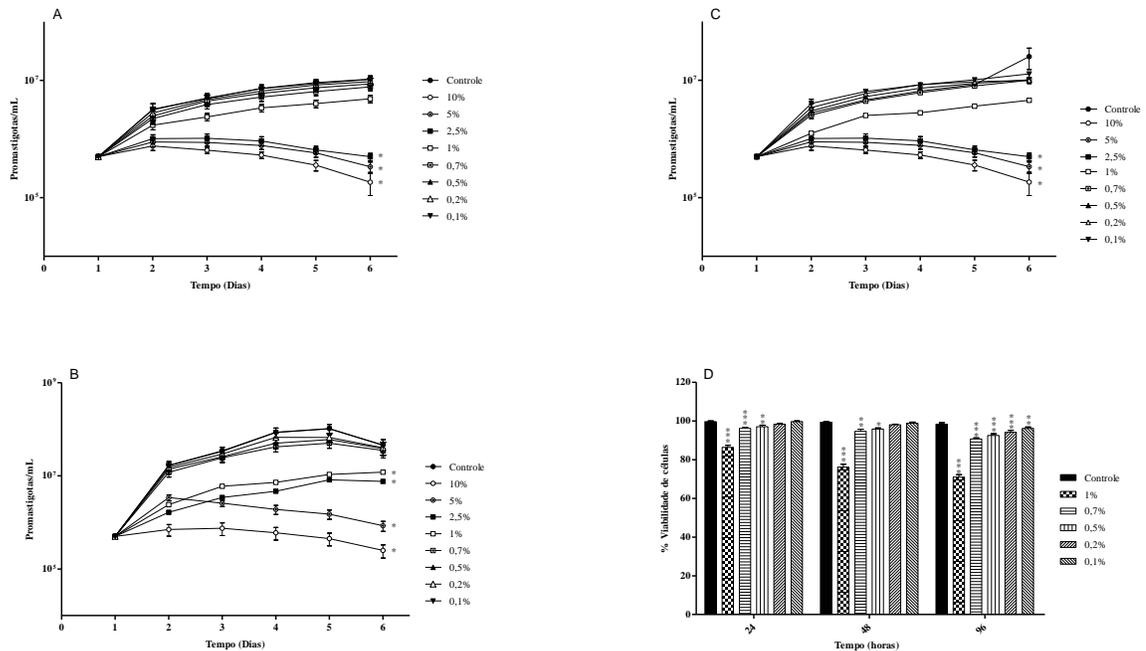


Gráfico 2 - Atividade leishmanicida de dimetilsulfóxido (DMSO) frente formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do DMSO sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem-se a resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05.

A pentamidina inibiu o crescimento de promastigotas em todas as espécies de *Leishmania* analisadas, não apresentando diferença de sensibilidade. A análise das curvas de crescimento de *L. amazonensis* (F = 14,62; P < 0,0001), *L. braziliensis* (F = 5,676; P < 0,0001) e *L. guyanensis* (F = 6,272; P < 0,0001; P < 0,001; P < 0,05) apresentam diferenças significativas no crescimento parasitário entre o grupo controle não tratados e os grupos tratados com todas as concentrações

testadas. Todas as concentrações analisadas nos tempos de 24 (F = 2,480; P < 0,0001); 48 (F = 2,480; P < 0,0001) e 96 h (F = 3,731; P < 0,0001) apresentaram diferença significativa na citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais quando comparadas com os grupos controle sem tratamento (Gráfico 3).

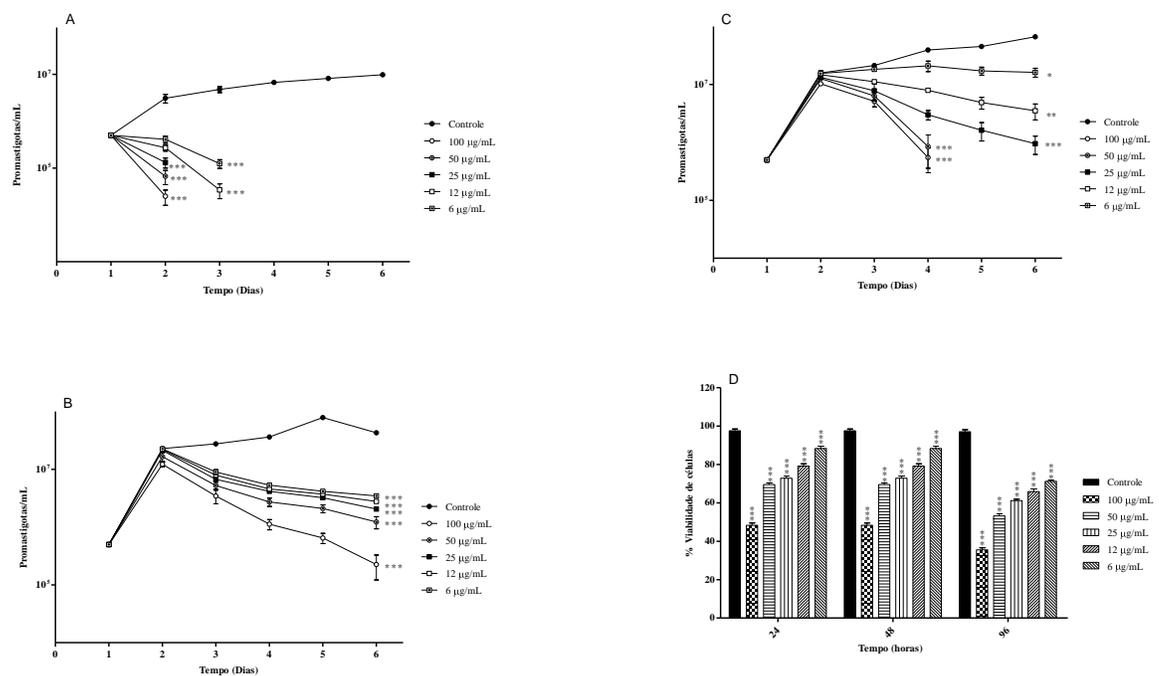


Gráfico 3 - Atividade leishmanicida da pentamidina frente formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito da pentamidina sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05.

5.3 AÇÃO LEISHMANICIDA NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp. E CITOTOXICIDADE

A atividade leishmanicida dos extratos das espécies *A. mucosa*, *A. sericea*, *E. amazonicus* e do alcalóide liriodenina foram avaliadas pela inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis in vitro*. As formas promastigotas foram tratadas com as concentrações de 100, 50, 25, 12 e 6 µg/mL dos extratos por seis dias. Os resultados expressos em CI₅₀ são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação da atividade leishmanicida em formas promastigotas *in vitro* dos extratos vegetais e substâncias.

Nome Botânico	Código	<i>Leishmania</i> spp. ^a CI ₅₀ (µg/mL) + SEM ^b					
		PH8	CA ^c	M2903	CA ^c	M4147	CA ^c
<i>Annona mucosa</i>	LIRIO	1,43 ± 0,58	AA	55,92 ± 3,55	MA	0,84 ± 0,07	AA
	EDF	9,32 ± 0,56	AA	27,42 ± 5,42	A	16,23 ± 1,30	A
	EHF	24,24 ± 1,51	A	65,27 ± 1,20	MA	153,37 ± 1,98	NA
	EMF	28,32 ± 1,15	A	44,74 ± 5,89	A	160,87 ± 2,52	NA
	EHS	44,22 ± 5,64	A	170,15 ± 1,46	NA	110,15 ± 1,44	NA
	EMS	46,54 ± 4,95	A	133,17 ± 5,41	NA	165,02 ± 1,87	NA
<i>Annona sericea</i>	FALASF	9,45 ± 0,17	AA	ND		ND	
	FALASGF	3,46 ± 0,09	AA				
	EHGFAS	0,40 ± 0,00	AA	151,82 ± 0,17	NA		
	EMGFAS	55,86 ± 2,87	MA	86,21 ± 0,09	MA		
	<i>Ephedranthus amazonicus</i>	FALEAF	2,47 ± 0,09	AA	ND		
FALEAGF		2,57 ± 0,01	AA	265,45 ± 0,66	NA		
	PENTA ^d	0,07 ± 0,00	AA	5,48 ± 0,00	AA	2,99 ± 0,00	AA

^a PH8, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; M2903, *Leishmania (Viannia) braziliensis*; M4147 *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

^b CI₅₀, 50% de Concentração Inibitória. Os valores são expressos em média ± SEM.

^c CA, Classificação da atividade. AA, altamente ativo; A, ativo; MA, moderadamente ativo; NA, não ativo.

^d Droga referência.

Para a determinação da citotoxicidade dos extratos orgânicos da espécie *A. mucosa* e o alcalóide liriodenina, os macrófagos foram tratados com as concentrações de 100, 50, 25, 12 e 6 µg/mL, sendo incubados por 24, 48 e 96 h. A citotoxicidade do alcalóide liriodenina e dos

extratos orgânicos em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, é dependente da concentração e do tempo de exposição. O alcalóide liriodenina, os extratos diclorometânico e metanólico das folhas de *A. mucosa* são tóxicos após 24 h de tratamento. O extrato hexânico das folhas de *A. mucosa* é tóxico após 48 h de tratamento. Os extratos hexânico e metanólico das sementes de *A. mucosa* são moderadamente tóxicos após 48 h de tratamento. Os resultados expressos em CL_{50} são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos vegetais e substâncias.

Nome Botânico	Código	Citotoxicidade CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) + SEM ^a					
		24 h	CT ^b	48 h	CT ^b	96 h	CT ^b
<i>Annona mucosa</i>	LIRIO	37,27 ± 1,49	T	34,40 ± 1,32	T	19,11 ± 1,06	T
	EDF	41,92 ± 1,17	T	29,15 ± 0,81	T	24,07 ± 0,72	T
	EHF	150,79 ± 2,54	MT	76,02 ± 4,43	T	62,63 ± 4,10	T
	EMF	45,91 ± 1,28	T	38,45 ± 1,10	T	29,41 ± 0,89	T
	EHS	9632,13 ± 1,50	PNT	462,62 ± 1,50	MT	262,33 ± 5,81	MT
	EMS	440,23 ± 1,43	MT	178,73 ± 3,56	MT	139,00 ± 3,13	MT
	PENTA ^c	111,52 ± 1,40	MT	111,52 ± 1,40	MT	51,99 ± 0,58	T

^a CL_{50} , 50% de Concentração Letal em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os valores são expressos em média ± SEM.

^b CT₅₀, Classificação da toxicidade. T, tóxico; MT, moderadamente tóxico; PNT, potencialmente não tóxico.

^c Droga referência.

As promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* foram altamente sensíveis ao alcalóide liriodenina (LIRIO) nos testes *in vitro* e as promastigotas de *Leishmania braziliensis* se mostraram moderadamente sensíveis ao mesmo. A curva de crescimento de *L. amazonensis* apresenta diferenças significativas ($F = 4,390$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas. Já a curva de crescimento de *L. braziliensis* ($F = 3,769$; $P > 0,05$) não apresentou diferenças significativas no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas. A

curva de crescimento de *L. guyanensis* não apresenta diferenças significativas ($F = 3,947$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com concentrações de 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Já os parasitas tratados com concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças significativas ($F = 3,947$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário quando comparados ao controle sem tratamento e tratado com DMSO (Gráfico 4).

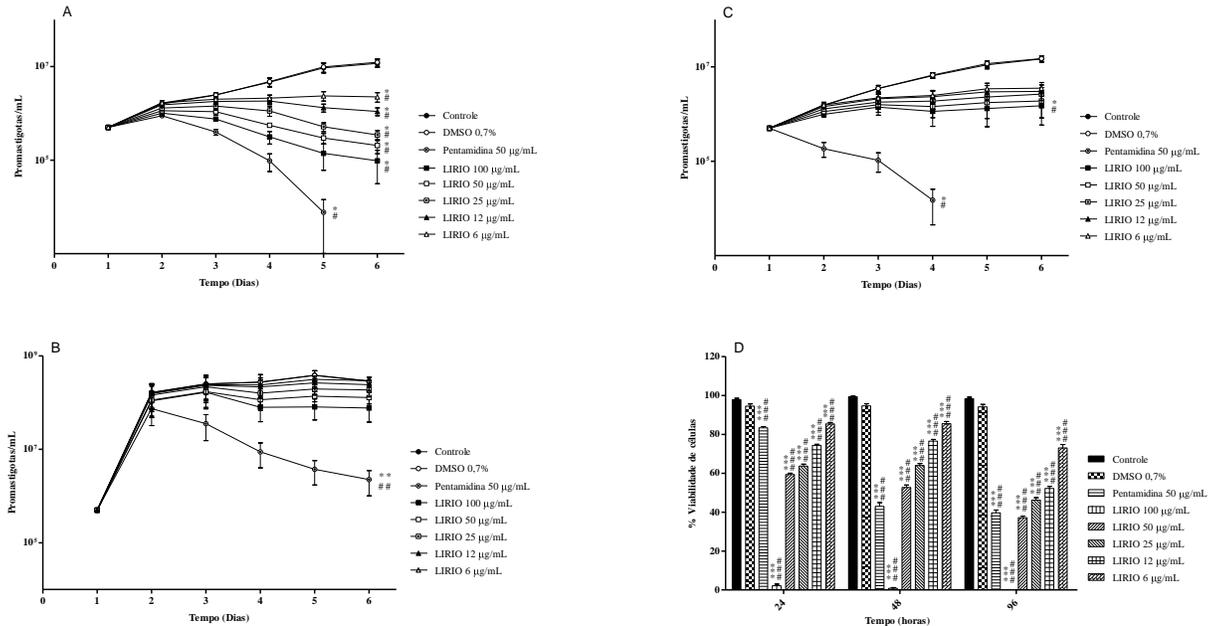


Gráfico 4 - Atividade leishmanicida do alcalóide lirioidenina (LIRIO) frente formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do LIRIO sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ### $P < 0,0001$; ## $P < 0,001$; # $P < 0,05$.

Todas as concentrações analisadas do LIRIO nos tempos de 24 ($F = 1,408$; $P < 0,0001$); 48 ($F = 8,712$; $P < 0,0001$) e 96 h ($F = 7,978$; $P < 0,0001$) apresentaram diferenças significativas na citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi observada a lise total dos macrófagos no tempo de 96 h (Gráfico 4D).

As promastigotas de *L. amazonensis* foram altamente sensíveis ao extrato diclorometânico das folhas de *A. mucosa* (EDF) nos testes *in vitro* e as promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* se mostraram sensíveis ao mesmo. A curva de crescimento de *L. amazonensis* não apresenta diferença significativa ($F = 6,573$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com concentrações de 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Observam-se diferenças significativas ($F = 6,573$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$) no crescimento parasitário quando comparados os grupos controle e os grupos tratados com concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Já a curva de crescimento de *L. braziliensis* não apresenta diferença significativa ($F = 2,511$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas. A curva de crescimento de *L. guyanensis* não apresenta diferença significativa ($F = 3,710$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratado e tratado com DMSO e os grupos tratados com concentrações de 50, 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Já os parasitas tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentam diferença significativa ($F = 3,710$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário quando comparados ao controle sem tratamento e tratado com DMSO (Gráfico 5).

A análise da viabilidade dos macrófagos tratados com EDF no tempo de 24 h não apresentou diferença significativa ($F = 1,830$; $P > 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados nas

concentrações 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$, essas concentrações não afetaram a viabilidade celular após 24 h de incubação. Já as concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças significativas ($F = 1,830$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO. As concentrações analisadas nos tempos de 48 ($F = 8,406$; $P < 0,0001$; $P < 0,05$) e 96 h ($F = 1,766$; $P < 0,0001$) apresentaram diferenças significativas na citotoxicidade nos grupos tratados com todas as concentrações testadas quando comparados com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi observado a lise total dos macrófagos no tempo de 96 h (Gráfico 5D).

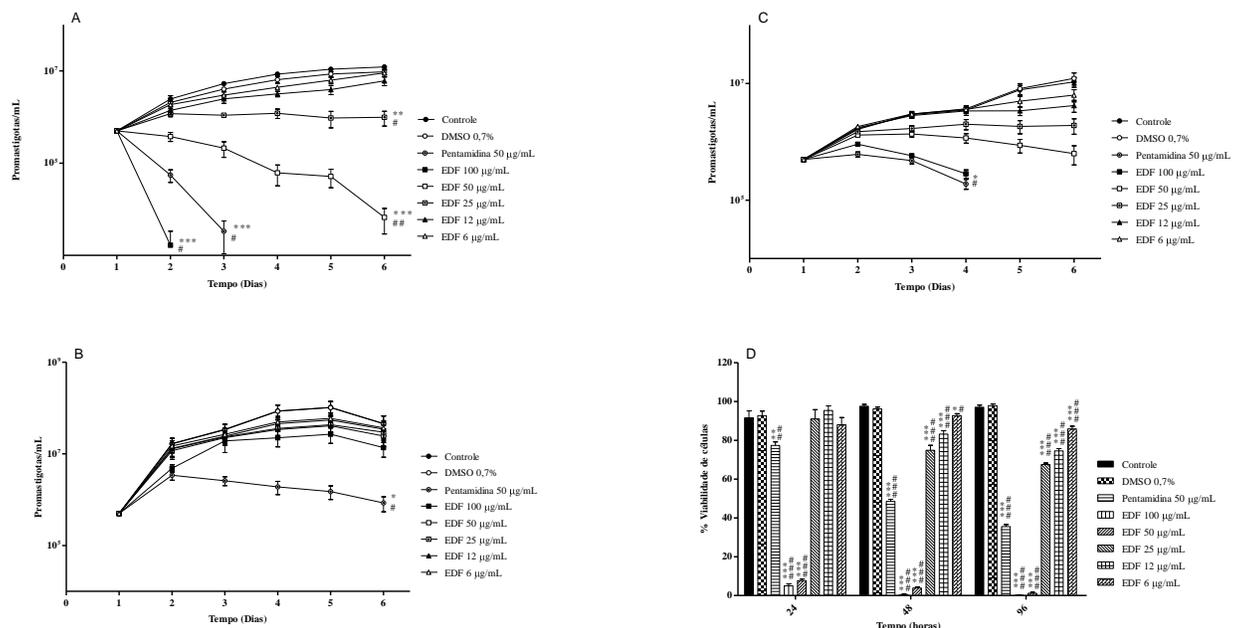


Gráfico 5 - Atividade leishmanicida do extrato diclorometano das folhas (EDF) de *Annona mucosa* frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do EDF sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ## $P < 0,0001$; ### $P < 0,001$; # $P < 0,05$.

O extrato hexânico das folhas de *A. mucosa* (EHF) é ativo frente formas promastigotas de *L. amazonensis* e moderadamente ativo frente formas promastigotas de *L. braziliensis* nos testes *in vitro*. As promastigotas de *L. guyanensis* se mostraram não sensíveis ao mesmo. A curva de crescimento de *L. amazonensis* na presença do EHF não apresenta diferença significativa ($F = 4,053$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com concentrações de 50, 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Já os parasitas tratados com concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença significativa ($F = 4,053$; $P < 0,05$) quando comparado com o controle sem tratamento e tratado com DMSO. As curvas de crescimento das espécies *L. braziliensis* ($F = 1,893$; $P > 0,05$) e *L. guyanensis* ($F = 1,756$; $P > 0,05$) não apresentam diferença significativa no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 6).

A análise da viabilidade dos macrófagos tratados com EHF nos tempos de 24 ($F = 1,432$; $P < 0,0001$) e 96 h ($F = 5,496$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$) apresentaram diferenças significativas na citotoxicidade nos grupos tratados com todas as concentrações testadas quando comparados com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO, sendo assim as concentrações afetaram a viabilidade celular. A análise da viabilidade dos macrófagos no tempo de 48 h não apresentou diferença significativa ($F = 4,329$; $P > 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$, essa concentração não afetou a viabilidade celular após 48 h de incubação. Observam-se diferenças significativas ($F = 4,329$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$) no tempo de 48 h na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados nas concentrações de 100, 50, 25 e 12 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 6D).

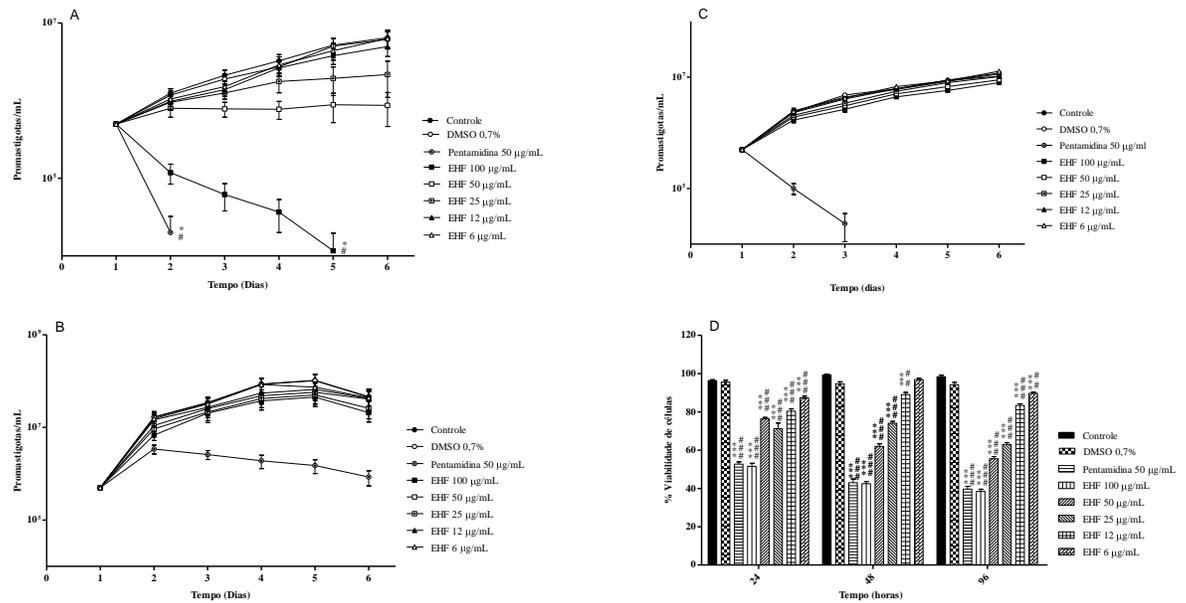


Gráfico 6 - Atividade leishmanicida do extrato hexânico das folhas (EHF) de *Annona mucosa* frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do EHF sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, $***P < 0,0001$; $*P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, $###P < 0,0001$; $##P < 0,001$; $\#P < 0,05$.

As promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram sensíveis ao extrato metanólico das folhas de *A. mucosa* (EMF) nos testes *in vitro* e as promastigotas de *L. guyanensis* se mostraram não sensíveis ao mesmo. A curva de crescimento de *L. amazonensis* não apresenta diferença significativa ($F = 4,218$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com concentrações de 50, 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Já os parasitas tratados com concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentam diferença significativa ($F = 4,218$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário quando comparados ao controle sem tratamento e tratado com DMSO. As curvas de crescimento das espécies *L. braziliensis* ($F = 2,014$; $P > 0,05$) e *L. guyanensis* ($F = 1,355$; $P > 0,05$) não apresentam diferença significativa no

crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas do EMF (Gráfico 7).

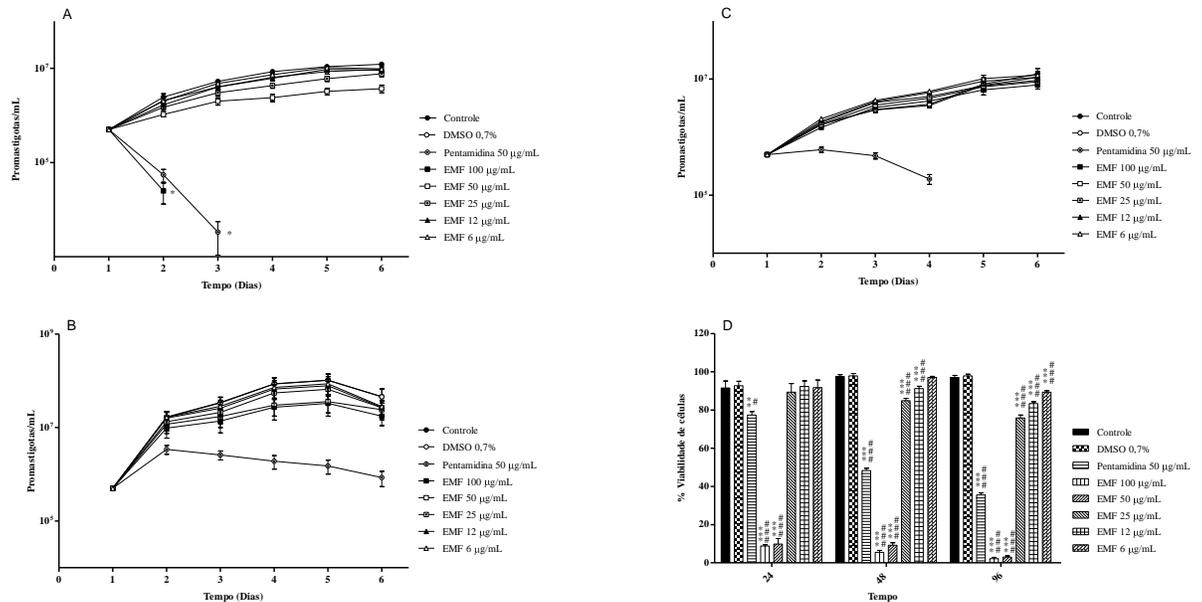


Gráfico 7 - Atividade leishmanicida do extrato metanólico das folhas (EMF) de *Annona mucosa* frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do EMF sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ### $P < 0,0001$; # $P < 0,05$.

A análise da viabilidade dos macrófagos tratados com EMF no tempo de 24 h não apresentou diferença significativa ($F = 1,498$; $P > 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados nas concentrações 25, 12 e 6 µg/mL. Já as concentrações de 100 e 50 µg/mL apresentaram diferenças significativas ($F = 1,498$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO. Essas concentrações afetaram a

viabilidade celular após 24 h de incubação. As concentrações analisadas nos tempos de 48 ($F = 1,294$; $P < 0,0001$) e 96 h ($F = 1,746$; $P < 0,0001$) apresentaram diferença significativa na citotoxicidade nos grupos tratados com todas as concentrações testadas quando comparados com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO (Gráfico 7D).

As promastigotas de *L. amazonensis* foram sensíveis ao extrato hexânico das sementes de *A. mucosa* (EHS) nos testes *in vitro* e as promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* se mostraram não sensíveis ao mesmo. As curvas de crescimento das espécies *L. amazonensis* ($F = 4,134$; $P > 0,05$); *L. braziliensis* ($F = 1,794$; $P > 0,05$) e *L. guyanensis* ($F = 1,776$; $P > 0,05$) não apresentam diferença significativa no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 8).

A análise da viabilidade dos macrófagos tratados com EHS no tempo de 24 h não apresentou diferença significativa ($F = 7,470$; $P > 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados nas concentrações 100, 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Já a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferença significativa ($F = 7,470$; $P < 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO, essa concentração afetou a viabilidade celular após 24 h de incubação. No tempo de 48 h não apresentou diferença significativa ($F = 2,552$; $P > 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados nas concentrações 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Já as concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença significativa ($F = 2,552$; $P < 0,0001$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO, essas concentrações afetaram a viabilidade celular após 48 h de incubação. As concentrações analisadas no tempo de

96 h ($F = 3,517$; $P < 0,0001$) apresentaram diferença significativa na citotoxicidade nos grupos tratados com todas as concentrações testadas quando comparados com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO (Gráfico 8D).

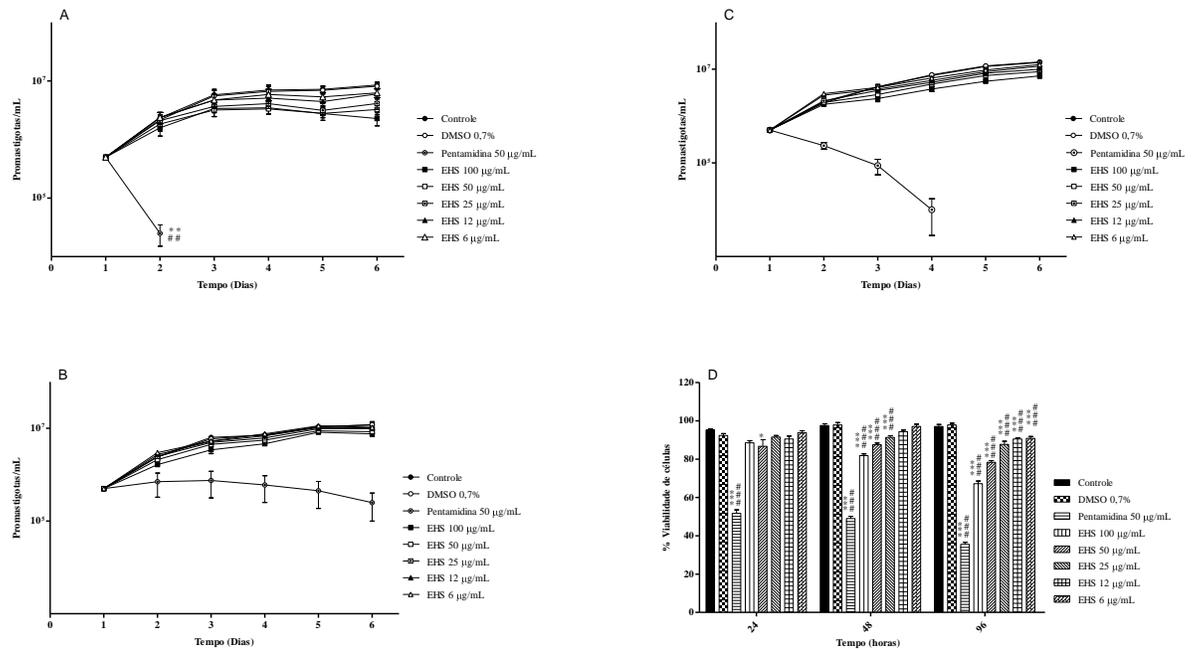


Gráfico 8 - Atividade leishmanicida do extrato hexânico das sementes (EHS) de *Annona mucosa* frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do EHS sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ## $P < 0,0001$; # $P < 0,001$.

O extrato metanólico das sementes de *A. mucosa* (EMS) é ativo frente formas promastigotas de *L. amazonensis* nos testes *in vitro*. As promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* se mostraram não sensíveis ao mesmo. As curvas de crescimento das espécies *L. amazonensis* ($F = 4,376$; $P > 0,05$); *L. braziliensis* ($F = 1,854$; $P > 0,05$) e *L. guyanensis* ($F =$

1,560; $P > 0,05$) não apresentam diferença significativa no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 9).

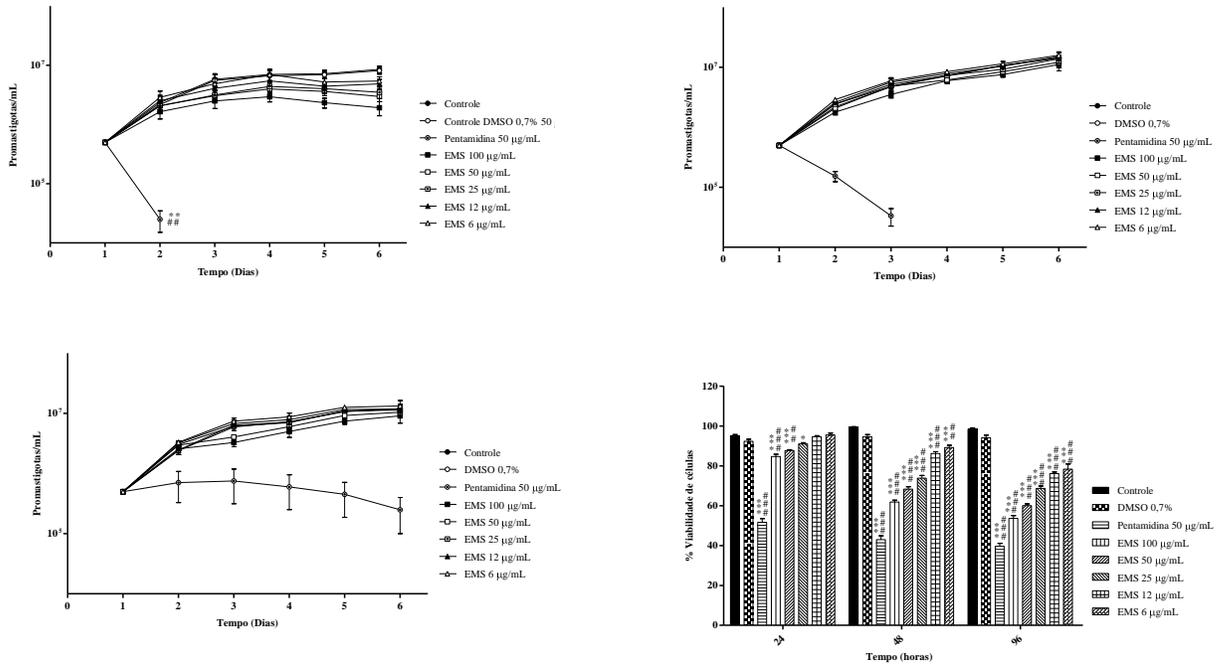


Gráfico 9 - Atividade leishmanicida do extrato metanólico das sementes (EMS) de *Annona mucosa* frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis* e (C) *Leishmania (Viannia) guyanensis*. (D) Efeito do EMS sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ## $P < 0,0001$; # $P < 0,001$.

A análise da viabilidade dos macrófagos tratados com EMS no tempo de 24 h não apresentou diferença significativa ($F = 2,258$; $P > 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados nas concentrações 12 e 6 µg/mL. Já as concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL apresentaram diferenças

significativas ($F = 2,258$; $P < 0,0001$; $P < 0,05$) na citotoxicidade quando comparadas com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO, essas concentrações afetaram a viabilidade celular após 24 h de incubação. As concentrações analisadas nos tempos de 48 ($F = 2,555$; $P < 0,0001$) e 96 h ($F = 2,083$; $P < 0,0001$) apresentaram diferença significativa na citotoxicidade nos grupos tratados com todas as concentrações testadas quando comparados com os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO (Gráfico 9D).

As promastigotas de *L. amazonensis* foram altamente sensíveis a fração alcaloídica das folhas de *A. sericea* (FALASF). A curva de crescimento não apresenta diferença significativa ($F = 4,854$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com concentrações de 25, 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Observam-se diferenças significativas ($F = 4,854$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário quando comparados os grupos controle e os grupos tratados com concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 10).

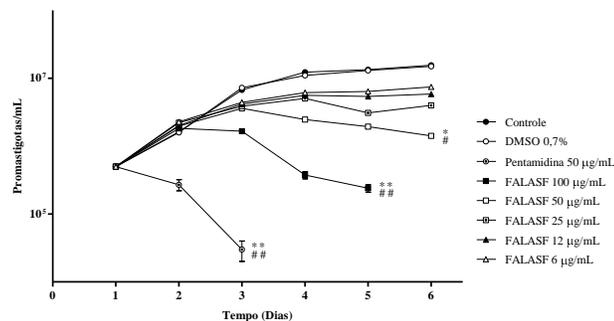


Gráfico 10 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica das folhas de *Annona sericea* (FALASF) frente as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ## $P < 0,001$; # $P < 0,05$.

As promastigotas de *L. amazonensis* foram altamente sensíveis a fração alcaloídica dos galhos finos de *A. sericea* (FALASGF). A análise da curva de crescimento apresenta diferenças significativas ($F = 6,427$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 11).

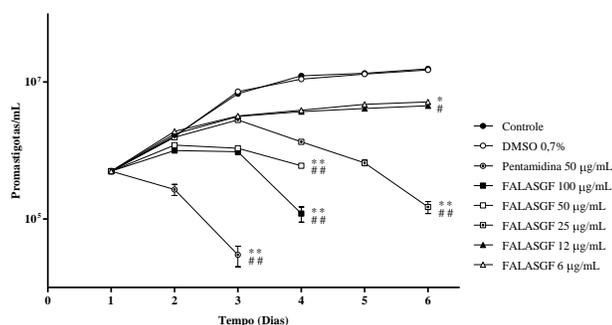


Gráfico 11 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica dos galhos finos de *Annona sericea* (FALASGF) frente as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, $**P < 0,001$; $*P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, $###P < 0,001$; $#P < 0,05$.

O extrato hexânico dos galhos finos de *A. sericea* (EHGFAS) foi a amostra com maior atividade frente as promastigotas de *L. amazonensis*, o mesmo não apresentou atividade frente as promastigotas de *L. braziliensis*. A curva de crescimento de *L. amazonensis* apresenta diferenças significativas ($F = 5,515$; $P < 0,001$) no crescimento parasitário entre os grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas. A curva de crescimento de *L. braziliensis* não apresenta diferenças significativas ($F = 2,368$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 12).

As promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram moderadamente sensíveis ao extrato metanólico dos galhos finos de *A. sericea* (EMGFAS). As curvas de crescimento de *L. amazonensis* ($F = 4,964$; $P > 0,05$) e *L. braziliensis* ($F = 3,121$; $P > 0,05$) não apresentam

diferenças significativas no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 13).

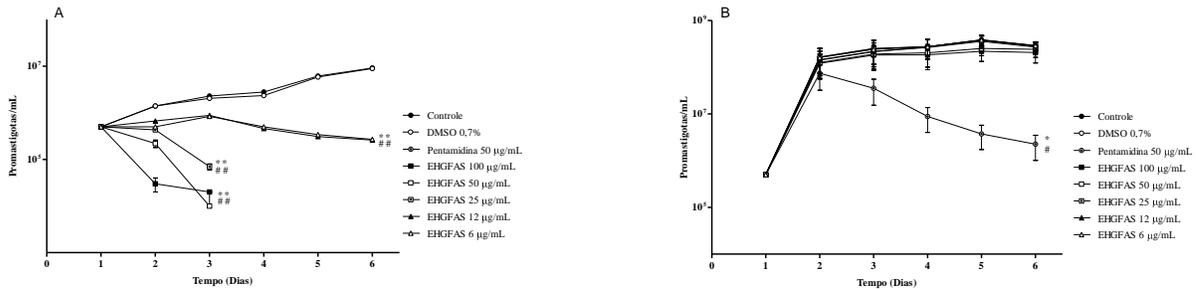


Gráfico 12 - Atividade leishmanicida do extrato hexânico dos galhos finos de *Annona sericea* (EHGFAS) frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ### $P < 0,001$; # $P < 0,05$.

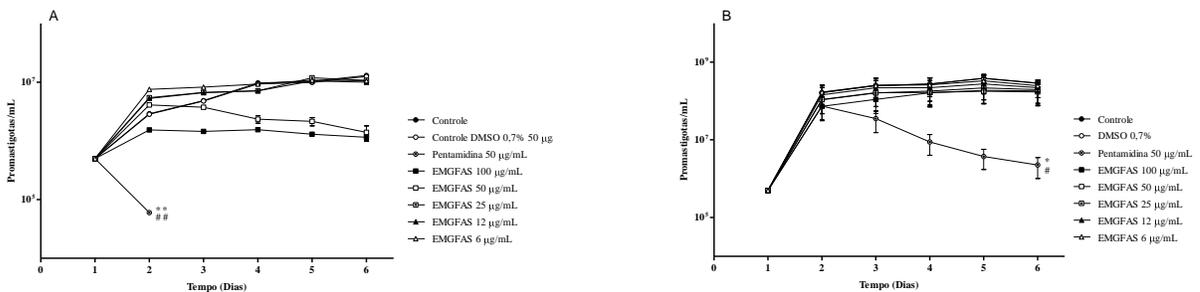


Gráfico 13 - Atividade leishmanicida do extrato metanólico dos galhos finos de *Annona sericea* (EMGFAS) frente as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ### $P < 0,001$; # $P < 0,05$.

As promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram altamente sensíveis a fração alcaloídica das folhas de *E. amazônicas* (FALEAF). A análise da curva de crescimento apresenta diferenças significativas ($F = 6,218$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário entre os

grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 14).

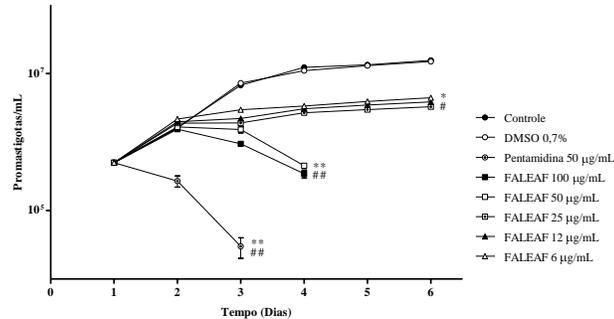


Gráfico 14 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica das folhas de *Ephedranthus amazonicus* (FALEAF) frente as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, $^{##}P < 0,001$; # $P < 0,05$.

As promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram altamente sensíveis a fração alcaloídica dos galhos finos de *E. amazônicas* (FALEAGF), o mesmo não apresentou atividade frente as promastigotas de *Leishmania braziliensis*. A curva de crescimento de *L. amazonensis* apresenta diferenças significativas ($F = 5,437$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas. A curva de crescimento de *L. braziliensis* não apresenta diferença significativa ($F = 2,417$; $P > 0,05$) no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 15).

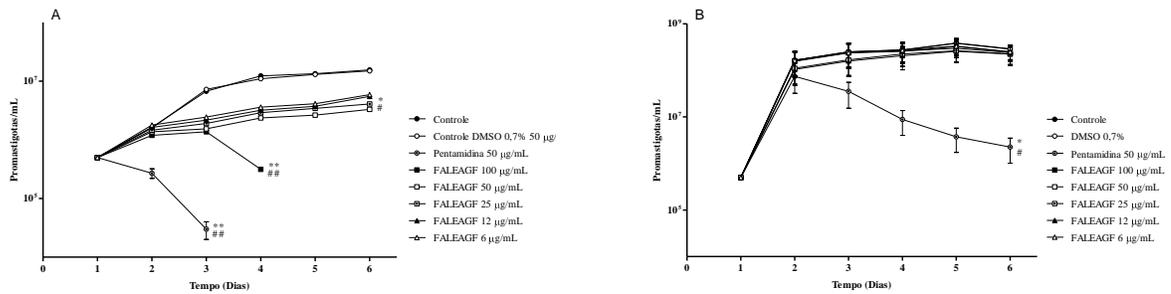


Gráfico 15 - Atividade leishmanicida da fração alcaloídica dos galhos finos de *Ephedranthus amazonicus* (FALEAGF) frente as formas promastigotas de (A) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e (B) *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Os resultados representam as médias de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, **P < 0,001; *P < 0,05. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, ##P < 0,001; #P < 0,05.

O critério usado para análise dos resultados nas pesquisas de compostos ativos com potencial terapêutico contra leishmania é o índice de seletividade (IS), comparando a citotoxicidade para macrófagos e a atividade leishmanicida. O IS consiste na razão CL_{50} para os macrófagos e CI_{50} para protozoários (CL_{50}/CI_{50}). Analisando a seletividade do alcalóide lirioidenina e dos extratos orgânicos frente a *L. amazonensis* todas foram seletivas ao parasita até 96 h (Tabela 5). Foram seletivas a *L. braziliensis* no tempo de 24 h as amostras EDF, EHF, EMF, EHS e EMS; no tempo de 48 h as amostras EDF, EHF, EHS e EMS e no tempo de 96 h as amostras EHS e EMS (Tabela 6). Foram seletivas a *L. guyanensis* no tempo de 24 e 48 h as amostras LIRIO, EDF, EHS e EMS e no tempo de 96 h as amostras LIRIO, EDF, EHS (Tabela 7).

Tabela 5 - Avaliação do índice de seletividade dos extratos vegetais e da substância isolada frente a *L. amazonensis*.

Nome Botânico	Código	IS ^a					
		24 h		48 h		96 h	
<i>Annona mucosa</i>	LIRIO	26,06	SL	24,05	SL	13,36	SL
	EDF	4,49	SL	3,12	SL	2,58	SL
	EHF	6,22	SL	3,13	SL	2,58	SL
	EMF	1,62	SL	1,35	SL	1,03	SL
	EHS	217,82	SL	10,46	SL	5,93	SL
	EMS	9,45	SL	3,84	SL	2,98	SL
	PENTA ^b	1.593,14	SL	1.593,14	SL	742,71	SL

^a Índice de seletividade (CL₅₀/CI₅₀). SL, seletivo a leishmania.

^b Droga referência.

Tabela 6 - Avaliação do índice de seletividade dos extratos vegetais e da substância isolada frente a *L. braziliensis*.

Nome Botânico	Código	IS ^a					
		24 h		48 h		96 h	
<i>Annona mucosa</i>	LIRIO	0,66	SM	0,61	SM	0,34	SM
	EDF	1,52	SL	1,06	SL	0,87	SM
	EHF	2,31	SL	1,16	SL	0,95	SM
	EMF	1,02	SL	0,85	SM	0,65	SM
	EHS	56,60	SL	2,71	SL	1,54	SL
	EMS	3,30	SL	1,34	SL	1,04	SL
	PENTA ^b	20,35	SL	20,35	SL	9,48	SL

^a Índice de seletividade (CL₅₀/CI₅₀). SL, seletivo a leishmania; SM, seletivo ao macrófago.

^b Droga referência.

Tabela 7 - Avaliação do índice de seletividade dos extratos vegetais e da substância isolada frente a *L. guyanensis*.

Nome Botânico	Código	IS ^a					
		24 h		48 h		96 h	
<i>Annona mucosa</i>	LIRIO	44,36	SL	40,95	SL	22,75	SL
	EDF	2,58	SL	1,79	SL	1,48	SL
	EHF	0,98	SM	0,49	SM	0,40	SM
	EMF	0,28	SM	0,23	SM	0,18	SM
	EHS	87,44	SL	4,19	SL	2,38	SL
	EMS	2,66	SL	1,08	SL	0,84	SM
	PENTA ^b	37,29	SL	37,29	SL	17,38	SL

^a Índice de seletividade (CL₅₀/CI₅₀). SL, seletivo a leishmania; SM, seletivo ao macrófago.

^b Droga referência.

5.4 EFEITO DO ALCALÓIDE LIRIODENINA E DOS EXTRATOS DE *Annona mucosa* SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

A atividade leishmanicida do alcalóide liriodenina e dos extratos de *A. mucosa* em amastigotas foram avaliadas pela inibição do desenvolvimento intracelular do parasita em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis in vitro*. A viabilidade celular das formas amastigotas foi avaliada após 24, 48 e 96 h de incubação pós-tratamento.

Em uma infecção com a proporção de 10 parasita para 1 macrófago, no grupo controle sem tratamento, a porcentagem de células parasitadas foi respectivamente de 40,66; 39,5 e 43,58% nos tempos de 24, 48 e 96 h após a infecção. Estes resultados e pré-testes realizados estabeleceram a taxa promastigota:macrófago de 10:1 para infecção e avaliação da atividade leishmanicida contra formas intracelulares de *L. amazonensis*, uma vez que esta razão fornece um número adequado de parasitos intracelulares nos tempos de infecção analisados.

A atividade leishmanicida do alcalóide liriodenina e dos extratos frente a formas amastigotas é confirmada quando comparados aos grupos controle sem tratamento e tratado com DMSO, pois se detectou diferenças significantes ($F = 15,31$; $P < 0,0001$) de taxa de infecção dos macrófagos nos tempos de incubação analisados (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (PH8).

Código	Taxa de infecção (%)			Amastigotas/Macrófago			Índice fagocítico		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
LIRIO	25,75	19,16	7,08	5,59	4,67	4,40	142,91	89,50	30,75
EDF	23,16	20,91	19,83	5,16	4,00	4,83	118,50	83,41	95,91
EHF	19,41	3,91	9,33	5,26	4,52	6,41	99,91	16,58	57,33
EMF	23,91	13,16	13,41	5,21	4,99	5,12	119,91	65,25	68,66
EHS	24,41	10,66	11,50	5,20	4,86	4,19	125,16	51,25	45,75
EMS	28,08	15,75	18,41	6,48	4,83	5,05	180,41	72,08	92,91

DMSO ^b	42,91	38,33	42,25	4,55	7,63	6,92	195,16	291,66	292,91
PENTA ^c	5,16	0,00	0,00	3,84	0,00	0,00	19,00	0,00	0,00
Controle	40,66	39,50	43,58	4,86	8,28	7,38	198,91	327,58	321,83

^a Os resultados representam a média de três experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%.

^b Promotor de solubilidade.

^c Droga referência.

Na concentração de 25 µg/mL o LIRIO, EDF, EMF, EHS e EMS apresentaram respectivamente redução de 92,92; 80,17; 86,59; 88,50 e 81,59% da taxa de infecção dos macrófagos após 96 h de tratamento; o EHF na concentração de 12 µg/mL reduziu em 90,67% a taxa de infecção dos macrófagos após 96 h de tratamento (Figura 16A). Avaliando o efeito dos tratamentos na carga parasitária durante os tempos propostos, os macrófagos infectados e tratados apresentaram valor acima de 70% de redução no número de amastigotas intracelulares em relação ao controle sem tratamento nos tempos analisados (Figura 16B).

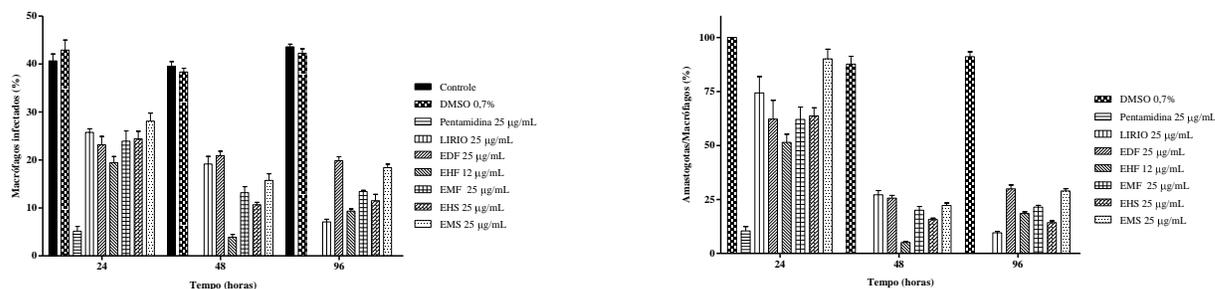


Gráfico 16 - Efeito do alcalóide liriodenina e dos extratos de *Annona mucosa* na (A) percentagem de macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonenesis* e na (B) carga parasitária (número de amastigotas/macrófagos) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Os resultados representam as médias de três experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). (B) Média dos controles referenciados como 100% de amastigotas/macrófagos: 24 h - 4,86 amastigotas/macrófagos, 48 h - 8,28 amastigotas/macrófagos e 96 h - 7,38 amastigotas/macrófagos.

5.4.1 EFEITO DO ALCALÓIDE LIRIODENINA E DOS EXTRATOS DE *Annona mucosa* NA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A resposta imunológica durante a infecção experimental foi avaliada pela capacidade do alcalóide liriodenina, dos extratos e da fração de ativar ou inibir os mecanismos microbicidas dos macrófagos, através da mensuração da produção de H_2O_2 e NO de macrófagos infectados e não infectados com *L. amazonensis*.

Primeiramente, avaliou-se a capacidade do alcalóide liriodenina e dos extratos interferirem no “burst” respiratório, através da quantificação de seu produto H_2O_2 pelos macrófagos peritoneais de camundongos.

Em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, o alcalóide liriodenina e os extratos orgânicos de *A. mucosa* induziram na presença de PMA a produção de H_2O_2 . O LIRIO e o EHF apresentaram diferença significativa ($F = 14,50$; $P < 0,001$) na produção de H_2O_2 quando comparados ao grupo controle incubado apenas com meio de reação. Os macrófagos tratados produzem em média respectivamente; 2,04 e 2,05 vezes mais H_2O_2 do que o controle. Apesar de ser observado uma discreta tendência de aumento na produção de H_2O_2 , estas não foram estatisticamente significativa ($F = 14,50$; $P > 0,05$) quando comparadas ao grupo estimulado por PMA (Gráfico 17).

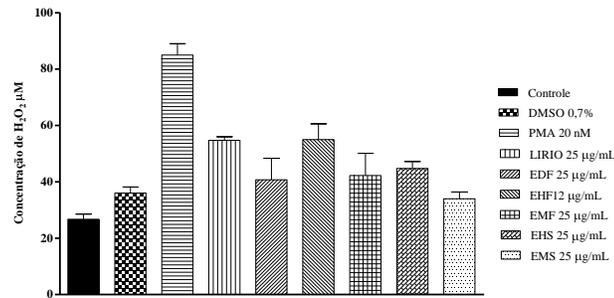


Gráfico 17 - Efeito do alcalóide liriodenina e dos extratos de *Annona mucosa* na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais.

Os resultados representam as médias de três experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM).

A análise da produção de NO_2^- pelo grupo controle sem tratamento no tempo de 24 e 48 h não apresentou diferença significativa ($F = 3,033$; $F = 2,995$; $P > 0,05$) entre macrófagos infectados e não infectados. A ativação esperada do mecanismo de defesa é confirmada no tempo de 96 h, pois observamos diferença significativa ($F = 3,201$; $P < 0,05$), os macrófagos infectados produzem 5,5 vezes mais NO_2^- do que os não infectados, sendo as médias de 36,86 e 6,62 μM , respectivamente.

Em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados pela *L. amazonensis*, o alcalóide liriodenina e os extratos orgânicos de *A. mucosa* não induziram a produção de óxido nítrico. Quando comparado os macrófagos infectados e não infectados, não foram detectadas diferenças significantes ($F = 3,033$; $F = 2,995$; $F = 4,094$; $P > 0,05$) de produção de NO_2^- nos grupos tratados com o alcalóide liriodenina e os extratos respectivamente nos tempos de 24, 48 e 96 h (Figura 18A).

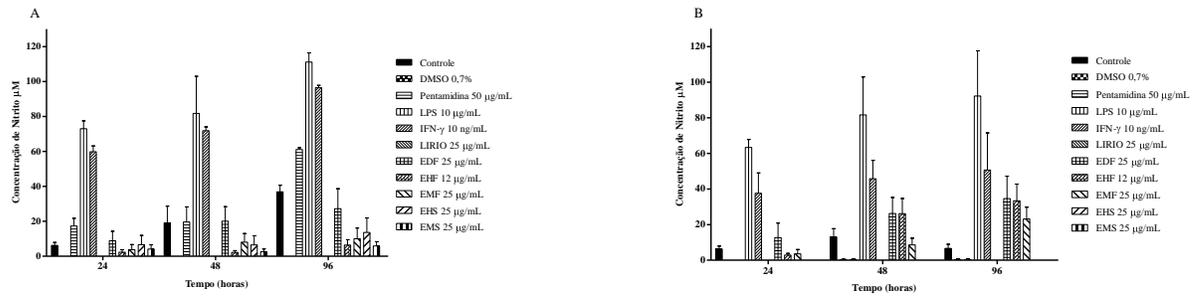


Gráfico 18 - Efeito do alcalóide liriodenina e dos extratos de *Annona mucosa* na produção de nitrito em macrófagos. (A) macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; (B) macrófagos não infectados.

Os resultados representam as médias de três experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM).

Em cultura de macrófagos peritoneais não infectados o EDF e EHF induziram a liberação de óxido nítrico. Nos tempos de 48 e 96 h não apresentaram diferença significativa ($F = 10,34$; $F = 6,950$; $P > 0,05$) na produção de NO_2^- quando comparados os macrófagos estimulados com INF- γ . Sendo as médias de INF- γ , EDF e EHF respectivamente de 47,72; 26,20 e 26,18 μM no tempo de 48 h e de 50,66; 34,56 e 33,34 μM no tempo de 96 h (Figura 18B).

5.5 BIOENSAIOS *IN VIVO*

Camundongos machos adultos entre 8 e 10 semanas de vida foram distribuídos nos grupos analisados, a infecção foi realizada com a cepa PH8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, por ser uma espécie de leishmânia frequente no Brasil (SHAW, 1994), além de que, os camundongos BALB/c são reconhecidamente susceptíveis, produzindo infecções progressivas e sem cura (MAIOLI *et al.*, 2004). A comparação entre a variação percentual de peso corporal e o diâmetro das patas dos grupos dos grupos foi realizada 35 dias pós-infecção (pré-tratamento), 49 dias pós-infecção (último dia de tratamento), 56 dias pós-infecção (7 dias pós-tratamento) e 63

dias pós-infecção (15 dias pós-tratamento). Não ocorreram perdas por morte ou fuga nos grupos durante o experimento.

5.5.1 EVOLUÇÃO DO PESO VIVO

Os camundongos BALB/c no início do experimento apresentavam média de peso corporal de 25,562 g. Na quinta semana, antes de iniciar o tratamento, a média dos grupos infectados foi de 29,345 g e dos grupos não infectados (sadios) foi de 28,691 g. A análise da variação percentual de peso não apresentou diferença significativa ($F = 3,912$; $P > 0,05$) entre os grupos infectados e os grupos não infectados (Gráfico 19 - 35 dias).

Na sétima semana, último dia de tratamento, a análise da variação percentual de peso apresentou diferença significativa entre o grupo controle infectado sem tratamento e o grupo infectado tratado com EDF ($F = 2,595$; $P < 0,05$) e o grupo sadio tratado com EDF ($F = 2,751$; $P < 0,05$). Não houve diferença significativa ($F = 2,057$; $P > 0,05$) na variação percentual de peso entre os outros grupos testados (Gráfico 19 - 49 dias).

Na primeira semana pós-tratamento, ou seja, oitava semana, a análise da variação percentual de peso apresentou diferença significativa ($F = 2,784$; $P < 0,05$) entre o grupo controle infectado sem tratamento e o grupo infectado tratado com creme lanette. Não houve diferença significativa ($F = 2,345$; $P > 0,05$) na variação percentual de peso entre os outros grupos testados (Gráfico 19 - 56 dias).

Na nona semana, dia que foi realizada a eutanásia, a análise da variação percentual de peso apresentou diferença significativa entre o grupo controle infectado sem tratamento e o grupo infectado tratado com EDF ($F = 3,189$; $P < 0,001$) e o grupo sadio tratado com EDF ($F = 3,197$; P

< 0,001). Não houve diferença significativa ($F = 2,930$; $P > 0,05$) na variação percentual de peso entre os outros grupos testados (Gráfico 19 - 63 dias).

Na vigência da infecção, os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa ($F = 18,39$; $P > 0,05$) na variação percentual de peso durante as nove semanas, não sendo detectado perda de peso. Entretanto, embora sem significância estatística, observa-se uma diminuição do peso corporal quando comparado o último dia de tratamento e a primeira semana pós-tratamento nos grupos sadios e infectados tratados com EDF e EHF, sendo as médias de variação de peso negativas de 0,02 e 0,04 g respectivamente.

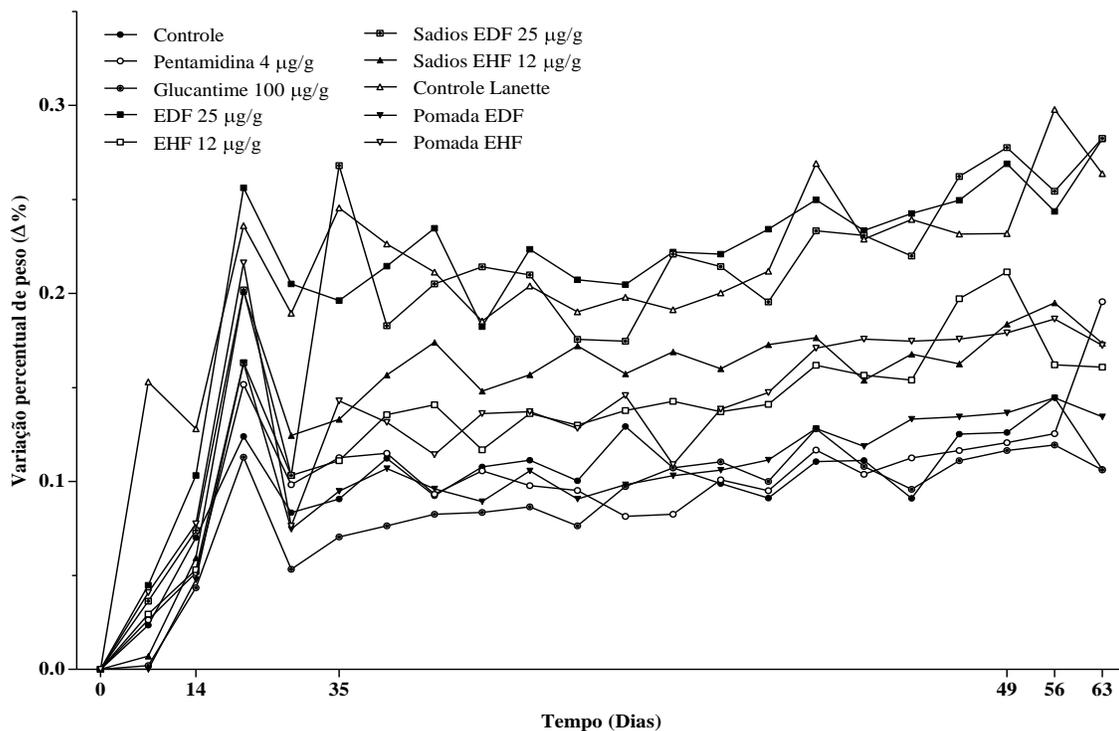


Gráfico 19 – (A) Variação de peso vivo (kg) de camundongos BALB/c nos pré-tratamentos e pós-tratamentos. A variação do peso corporal dos animais foi verificada 35 dias pós-infecção (pré-tratamento), 49 dias pós-infecção (último dia de tratamento), 56 dias pós-infecção (7 dias pós-tratamento) e 63 dias pós-infecção (15 dias pós-tratamento). Os resultados representam as médias de dois experimentos com quatro animais por grupo experimental com intervalo de confiança de 95%.

5.5.2 DESENVOLVIMENTO E TRATAMENTO DA LESÃO CUTÂNEA

No dia da infecção dos camundongos BALB/c por *L. amazonensis* a média do diâmetro das patas era de 1,32 mm. Os grupos infectados apresentaram lesões a partir da quarta semana de infecção. Analisando individualmente o resultado de cada grupo, na quinta semana, antes de iniciar o tratamento, a média da lesão na pata dos grupos infectados foi de 1,08 mm. Os grupos infectados apresentavam diferença significativa ($F = 19,88$; $P < 0,0001$) quando comparados aos grupos não infectados (Gráfico 20 - 35 dias).

Na sétima semana, final tratamento, todos os grupos infectados tratados apresentaram lesões, observando diferenças significativas ($F = 12,77$; $P < 0,0001$; $P < 0,001$; $P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle infectado sem tratamento com média de lesão na pata 2,922 mm (Gráfico 20 - 49 dias). Os grupos infectados tratados com creme lanette, pentamidina e glucantime apresentaram respectivamente redução da lesão na pata de 25,39; 45,51 e 36,85 % quando comparados ao controle sem tratamento. Enquanto que os grupos infectados tratados com EDF intraperitoneal, EHF intraperitoneal, pomada a base de EDF e pomada a base de EHF apresentaram redução da lesão na pata respectivamente de 50,37; 70,91; 44,04 e 42,40 % quando comparados ao controle sem tratamento.

Com o objetivo de analisar a eficiência das amostras pós-tratamento os animais foram acompanhados por mais duas semanas. Na primeira semana pós-tratamento a média do grupo infectado sem tratamento foi de 3,227 mm e dos grupos infectado tratados foi de 2,911 mm, não apresentando diferença significativa na média da lesão ($F = 12,27$; $P > 0,05$), sendo observado um aumento progressivo das lesões nos grupos tratados (Gráfico 20 – 56 dias). Entretanto quando analisamos os grupos infectados pós-tratamento estes apresentam média de redução da lesão na

pata de 9,79 %, enquanto que o grupo infectado tratado com EHF apresenta 47,41 % de redução quando comparados ao controle sem tratamento.

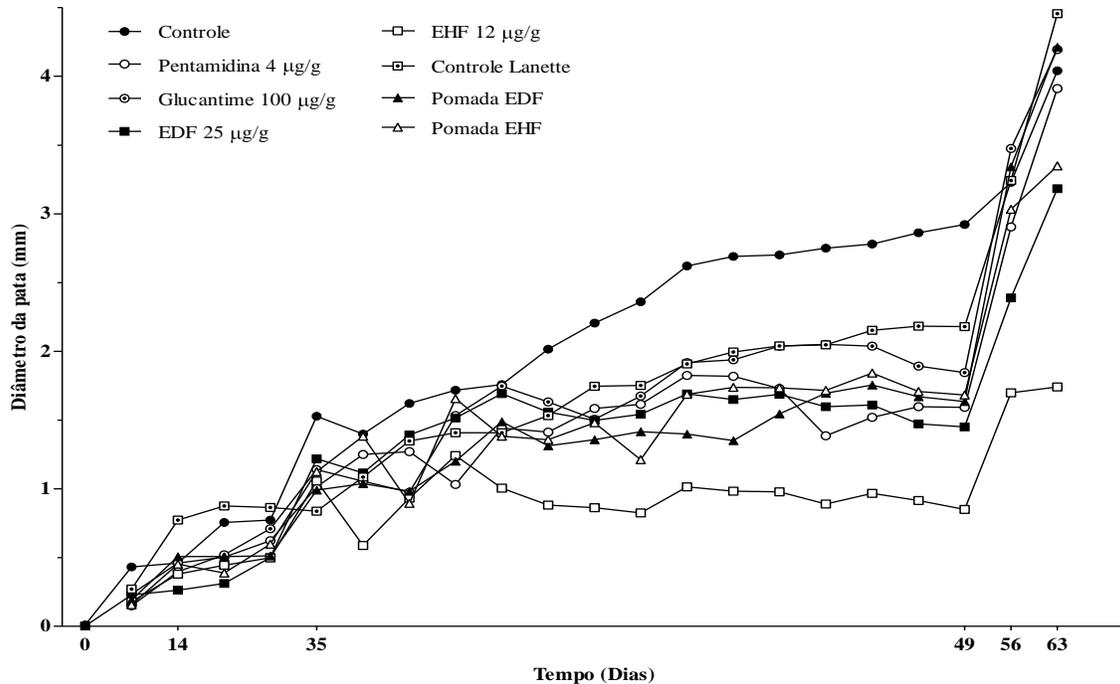


Gráfico 20 - Diâmetro da lesão (mm) das patas de camundongos BALB/c nos pré-tratamentos e pós-tratamentos.

A variação do diâmetro da lesão das patas dos animais foi verificada 35 dias pós-infecção (pré-tratamento), 49 dias pós-infecção (último dia de tratamento), 56 dias pós-infecção (7 dias pós-tratamento) e 63 dias pós-infecção (15 dias pós-tratamento).. Os resultados representam as médias de dois experimentos com quatro animais por grupo experimental com intervalo de confiança de 95%.

As lesões permaneceram com crescimento progressivo durante a semana nos grupos tratados. Na segunda semana pós-tratamento (Figura 26), a média da lesão do grupo infectado sem tratamento era de 4,040 mm e dos grupos infectado tratados era de 3,630 mm (Gráfico 20 – 63 dias), não apresentando diferença significativa no tamanho da lesão ($F = 8,751$; $P > 0,05$).



Figura 26 – Lesão das patas de camundongos BALB/c duas semanas pós-tratamento.

5.5.3 EXAME PARASITOLÓGICO – LDA

O critério clínico de análise *in vivo* da infecção é realizado pela medição da lesão cutânea, que auxilia a avaliação da cura. Contudo o critério parasitológico (LDA) é o principal método de avaliação quando se pretende comparar a eficácia entre uma droga e outra e não avaliar se o animal está parasitologicamente curado (COSTA FILHO *et al.*, 2008).

Os grupos infectados tratados com EDF intarperitoneal, EHF intraperitoneal e pomada a base de EHF quando comparados com o grupo controle infectado sem tratamento apresentaram diferença significativa ($F = 8,001$; $P < 0,001$), reduzindo a carga parasitária respectivamente em 27,11; 26,44 e 13,55 %. Os resultados mais eficazes foram observados nos grupos infectados tratados com pentamidina e glucantime, reduzindo a carga parasitária respectivamente em 96,04 e 91,97 %. A análise da média da carga parasitária não apresentou diferença significativa ($F = 8,001$; $P > 0,05$) entre o grupo controle infectado sem tratamento e os grupos infectados tratados com creme lanette e pomada a base de EDF. O creme lanette e a pomada a base de EDF foram capazes de reduzir a carga parasitária respectivamente em 1,12 e 4,74 % (Gráfico 21).

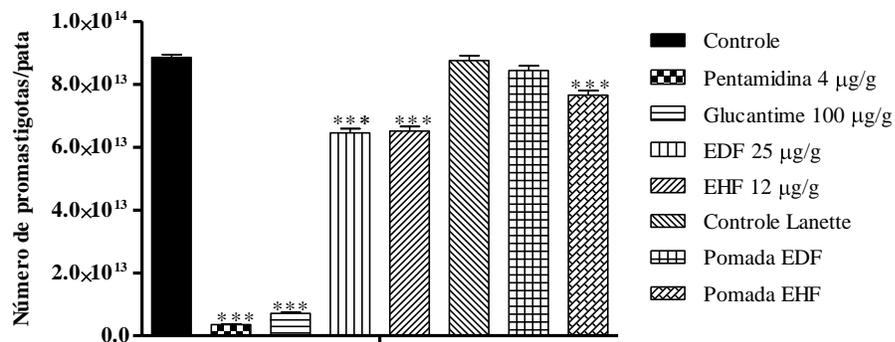


Gráfico 21 – Número de promastigotas por pata de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pós-tratamentos.

Os resultados representam as médias de dois experimentos com quatro animais por grupo experimental com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *** $P < 0,0001$.

5.6 PERFIL FITOQUÍMICO

Técnicas cromatográficas e reagentes cromogênicos foram utilizadas para avaliar o EDF e o EHF. O EDF apresentou teste positivo ao reagente Dragendorff, evidenciando misturas complexas de substâncias alcaloídicas. Através de marcha química convencional para alcalóides e técnicas cromatográficas forneceu uma mistura alcaloídica, a partir da qual foram isolados e identificados com base, principalmente nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , em comparação com a literatura (COSTA *et al.*, 2011) os compostos 1 e 2 (Figura 27).

Liriodenina (1): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.87 (^1H , d, $J = 5.2$ Hz, H-5), 8.61 (^1H , ddd, $J = 8.1$, 1.0 e 0.5 Hz, H-11), 8.57 (^1H , ddd, $J = 7.9$, 1.4 e 0.5 Hz, H-8), 7.75 (^1H , d, $J = 5.2$ Hz, H-4), 7.73 (^1H , ddd, $J = 8.1$, 7.4 e 1.4 Hz, H-10), 7.56 (^1H , ddd, $J = 7.9$, 7.4 e 1.0 Hz, H-9), 7.16 (^1H , s, H-3), 6.37 (^2H , s, 1-OCH₂O-2).

Atherospermidina (2): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.88 (^1H , d, $J = 5.3$ Hz, H-5), 8.50 (^1H , dd, $J = 8.2$ e 1.5 Hz, H-11), 8.52 (^1H , dd, $J = 8.1$ e 1.5 Hz, H-8), 8.11 (^1H , d, $J = 5.3$ Hz, H-4), 7.67 (^1H , ddd, $J = 8.2$, 7.2 e 1.5 Hz, H-10), 7.47 (^1H , ddd, $J = 8.0$, 7.2 e 1.5 Hz, H-9), 6.30 (^2H , s, 1-OCH₂O-2), 4.28 (^3H , s, H₃CO-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 182.6 (C-7), 149.5 (C-1), 144.9 (C-6a), 144.3 (C-5), 136.3 (C-2), 136.1 (C-3), 134.1 (C-10), 133.1 (C-11a), 130.61 (C-7a), 130.64 (C-3a), 128.5 (C-8), 127.4 (C-9), 126.7 (C-11), 122.8 (C-3b), 119.5 (C-4), 102.6 (C-1a), 102.3 (1-OCH₂O-2), 60.2 (H₃CO-3).

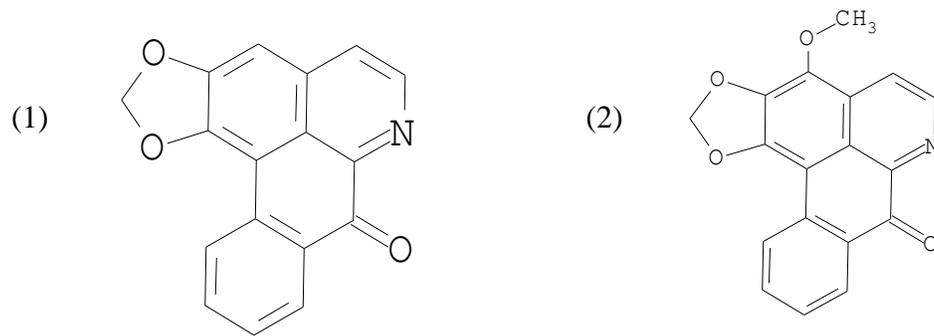


Figura 27 - Estruturas dos alcalóides Líriodenina (1) e Atherospermidina (2).

A partir do EHF foram obtidos dois sólidos cristalinos de odor agradável, identificados, com base principalmente nos espectros de RMN ¹H, como uma mistura de hidrocarbonetos, comumente encontrados em folhas.

6. DISCUSSÃO

Muitas sociedades tradicionais possuem uma vasta farmacopéia natural, em boa parte proveniente dos recursos vegetais encontrados nos ambientes naturais ocupados por estas populações, ou cultivados em ambientes antropicamente alterados. O interesse acadêmico a respeito do conhecimento que estas populações detêm sobre plantas e seu uso tem crescido, após a constatação de que a base empírica desenvolvida por elas ao longo de séculos pode, em muitos casos, ter uma comprovação científica, que habilitaria a extensão destes usos à sociedade industrializada (AMOROZO, 2002). Como parte da pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, o Programa de Doenças Tropicais da OMS vem considerando essencial e de alta prioridade a investigação sobre o uso de plantas no tratamento de leishmaniose (WHO, 2002).

O efeito leishmanicida dos compostos isolados de espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* (BARATA *et al.*, 2000). A triagem de agentes leishmanicidas, classicamente utiliza formas promastigotas, devido à sua simplicidade e baixo custo do cultivo *in vitro* (FUMAROLA, 2004). Nesta abordagem as formas promastigotas são expostas *in vitro* a diferentes concentrações dos compostos a serem testados e a taxa de inibição do crescimento dos parasitos é determinada após incubação. No entanto, uma vez que a forma promastigota não é a forma infectante do parasita nos vertebrados, a atividade leishmanicida observada é um valor indicativo da possível atividade do metabólito. A avaliação

frente a formas promastigotas então é considerada preliminar, e deve ser complementada com uma avaliação frente a formas amastigotas intracelulares, em macrófagos infectados. Simultaneamente deve-se realizar a avaliação da possível citotoxicidade do metabolito. É recomendado o uso de macrófagos não parasitados, a fim de estabelecer se a atividade *in vitro* do metabolito está relacionada com sua atividade citotóxica geral, ou se ele possui uma atividade seletiva frente a *Leishmania* spp (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Inicialmente, foi realizada a curva de crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. A realização de curvas de crescimento é fundamental para a manutenção e uso das culturas de *Leishmania* spp. É possível determinar a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento de microorganismos em cada sistema de cultivo, a determinação desta fase é importante uma vez que autores sugerem uma associação entre a fase de crescimento da cultura e o sucesso da manutenção da cultura (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1974; BOGDAN, 1990). Com a obtenção das curvas de crescimento e a observação da morfologia das formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, determinou-se a fase exponencial tardia e a fase estacionária, sendo assim, possível definir os dias que as cepas tinham a maior probabilidade de estarem infectantes.

Baseado-se nos resultados das curvas de crescimento foi definido o sexto dia para manutenção e uso das cepas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* e o quinto dia para as cepas de *L. braziliensis*. Passos (2004) e Silva (2008) apresentaram resultados de crescimento de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* semelhantes aos identificados no presente estudo. Os resultados não corroboram com os analisados por Silva (2008) que observou no sétimo dia o crescimento máximo de suas cepas de *L. braziliensis*.

As cepas de *L. braziliensis* apresentaram curva crescimento acelerado em relação a *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, resultando em diferenças no tempo de replicação celular. As variações observadas podem ser justificadas pelas diferentes condições de cultivo e origem das cepas. As cepas de *L. braziliensis* foram cultivadas em meio *Scnneider*, enquanto que *L. amazonensis* e *L. guyanensis* foram cultivadas em meio RPMI.

No presente estudo, o solvente DMSO foi calibrado a 0,7% indicando que sua utilização não estava contribuindo com a mortalidade das formas promastigotas de *Leishmania* spp e os resultados encontrados foram somente relacionados às amostras. Na literatura são encontrados trabalhos utilizando concentrações variadas de DMSO em formas promastigotas de *Leishmania* spp. Concentrações de 0,1; 0,25; 1; 1,6 e 5% de DMSO não afetaram formas promastigotas de *L. amazonensis* (QUEIROZ *et al.*, 1996; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1996; WAECHTER *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2007; OSÓRIO *et al.*, 2007; NUNES, 2008; COSTA *et al.*, 2009; SATALAYA, 2009), e *L. braziliensis* (QUEIROZ *et al.*, 1996; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1996; WAECHTER *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2006; OSÓRIO *et al.*, 2007; SATALAYA, 2009; MONZOTE *et al.*, 2010). Concentração de 1,6% de DMSO não afetou formas promastigotas de *L. guyanensis* (COSTA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009).

Diante dessas considerações, três espécies da família Annonaceae foram selecionadas para avaliação preliminar frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Plantas da família Annonaceae produtoras de alcalóides e acetogeninas vêm mostrando resultados promissores contra protozoários (ROCHA *et al.*, 2005).

O alcalóide liriodenina e os extratos orgânicos de *A. mucosa*, *A. sericea* e *E. amazonicus* analisados nesse estudo apresentaram atividade leishmanicida frente as formas promastigotas de *Leishmania* spp. A atividade biológica de extratos oriundos de diferentes partes vegetais

investigadas parece estar relacionada à presença de metabólitos secundários, tais como os flavonóides (92%), alcalóides (88%), taninos (83%), triterpenóides (67 %), antraquinones (42%), esteróides (33%), saponinas (25%) e cumarinas (17%) (BRAGA *et al.*, 2007). Estudos anteriores mostraram atividades de extratos do gênero *Annona* (sinonímia *Rollinia*) contra promastigotas de *Leishmania* spp. (FEVRIER *et al.*, 1999; OSÓRIO *et al.*, 2007). No mesmo experimento a pentamidina, medicamento padrão de segunda escolha apresentou atividade leishmanicida sendo considerada altamente ativa frente às espécies *L. amazonensis*; *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Em nosso estudo, o alcalóide liriodenina inibiu o crescimento de promastigotas em todas as espécies de *Leishmania* estudadas, foi observado diferença de sensibilidade entre as formas promastigotas analisadas. Estudos anteriores relataram a avaliação da atividade da liriodenina isolado de diferentes espécies de anonáceas, sendo observada atividade frente a diferentes espécies de *Leishmania* com uma grande variação na concentração de inibição do crescimento parasitário (QUEIROS *et al.*, 1996; FÉRVRIES *et al.*, 1999; WAECHTER *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2006). O extrato diclorometânico das folhas apresentou maior atividade na inibição das formas promastigotas das *Leishmanias* spp. quando comparado com os outros extratos. Os resultados indicam que os extratos hexânico e metanólico das folhas são eficazes na inibição das formas promastigotas de *L. amazonensi* e *L. braziliensi*. Os extratos hexânico e metanólico das sementes são eficazes na inibição das formas promastigotas de *L. amazonensis*. Diferenças de sensibilidade de formas promastigotas de *Leishmania* spp. frente aos extratos foram observadas. Os resultados da atividade do extrato hexânico das folhas reportam a essa diferença. Sendo o mesmo ativo frente a *L. amazonensis*, moderadamente ativo frente a *L. braziliensis* e não ativo frente a *L. guyanensis*. A variação observada na atividade biológica pode estar relacionada ao uso

de meios bifásicos ou líquidos para a avaliação da atividade leishmanicida (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRIGUEZ, 2001).

A avaliação da citotoxicidade das drogas frente a macrófagos tem o objetivo de verificar se as substâncias afetam o hospedeiro do parasita (SILVA, 2009), pois as mesmas possuem centenas de componentes e alguns podem ser muito citotóxicos (CALIXTO, 2000). Neste trabalho, a citotoxicidade foi dependente da concentração e do tempo de exposição.

A citotoxicidade da pentamidina foi avaliada, uma vez que lhe têm sido atribuídos efeitos colaterais imediatos e tardios, além de apresentar toxicidade elevada, sendo descritos casos de morte repentina (RATH *et al.*, 2003). Entre os efeitos colaterais imediatos incluem-se hipotensão, náuseas, vômitos e síncope. Atuam sistemicamente no metabolismo da glicose, gerando hipoglicemia em 8% dos casos e o efeito diabetogênico. Na fase mais tardia, atingem 5% dos casos, sendo a alteração mais frequente, a renal (PAULA *et al.*, 2003). Considerando a disponibilidade e obtenção das amostras foi proposto avaliar a citotoxicidade do alcalóide liriodenina e dos extratos orgânicos *A. mucosa* em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c para estabelecer as concentrações ideais de incubação das células, sem afetar a viabilidade celular.

O alcalóide liriodenina, os extratos diclorometânico e metanólico das folhas de *A. mucosa* são tóxicos após 24 h de tratamento. O extrato hexânico das folhas de *A. mucosa* é tóxico após 48 h de tratamento. Os extratos hexânico e metanólico das sementes de *A. mucosa* são moderadamente tóxicos após 48 h de tratamento. Estudos anteriores relacionam a atividade citotóxica das Annonaceas a partir do isolamento e análise de substâncias (SAHPAZ *et al.*, 1994; JARAMILHO *et al.*, 2000; OSÓRIO *et al.*, 2007). O alcalóide liriodenina contra diferentes linhagens de células *in vitro*, como KB, A-549, HCT-8, P-388 e L-1210 (WU *et al.*, 1988;

GUINAUDEAU, *et al.*; 1994); *R. membranacea* (sinonímia *A. rensoniana*), sendo atribuída as acetogeninas isoladas e identificadas como rolliniastatin-1 e rolliniastatin-2 (DEGLI ESPOSTE *et al.*, 1994); extratos hexânico e metanólico das folhas de *R. pitteri* (sinonímia *A. papilionella*) frente a células de linhagem U-937 (OSÓRIO *et al.*, 2007).

A atividade observada em estudos anteriores foi atribuída as acetogeninas, compostos que apresentam diversas atividades biológicas relatadas na literatura, incluindo citotoxicidade, o que fez deste constituinte bioativo objeto de inúmeras pesquisas. Possui capacidade inibitória sobre o complexo-I (NADH ubiquinona oxidoredutase) de cadeia respiratória mitocondrial em mamíferos e insetos. A NADH ubiquinona oxidoredutase, forma o complexo I da cadeia transportadora e sua inibição leva a um bloqueio parcial na fosforilação oxidativa e produção de ATP (RUPRECHT *et al.*, 1990; DEGLI ESPOSTE *et al.*, 1994; ZAFRA-POLO *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* mostraram um efeito citotóxico preferencial sobre células neoplásicas em comparação com as células saudáveis, sugerindo um potencial antitumoral destes agentes, demonstrando extraordinária seletividade entre certas linhagens celulares (ALALI *et al.*, 1999; FAGUNDES *et al.*, 2005; ALVAREZ-GONZALEZ, 2008).

Considerando os resultados da avaliação da atividade leishmanicida do alcalóide lirioidenina e dos extratos orgânicos *A. mucosa* frente as formas promastigotas de *leishmania amazonensis* e de citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais de camundongos BAL/c, foi possível estabelecer concentrações ideais para a realização da avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* contra a forma amastigota. Esta avaliação fornece informações sobre a capacidade do composto de chegar a níveis adequados ao vacúolo parasitóforo, mantendo seu efeito leishmanicida. Este tipo de estudo avalia ainda potenciais efeitos do fármaco sobre a

célula, favorecendo ou inibindo o desenvolvimento das leishmanias em seu interior, classicamente são utilizados macrófagos peritoniais murinos (CHANG, 1980).

A quimioterapia em leishmaniose tem como alvo as formas amastigotas intracelulares do parasita. A forma amastigota reside no vacúolo parasitóforo, que se assemelha a um lisossoma secundário com um pH de 4,5 - 5,0. O ambiente ácido tem implicações para as estratégias da amastigota na aquisição de nutrientes e homeostase de íons. Estas estratégias envolvem uma variedade de transportadores que podem mediar a absorção de droga ou o efluxo da droga, desempenhando um papel na susceptibilidade do parasita (CROFT & COOMBS, 2003).

Poucos estudos com produtos botânicos abordam a atividade leishmanicida em formas amastigotas, em sua maioria apenas a atividade leishmanicida em formas promastigotas são reportadas nos trabalhos mais recentes. A eficácia de um composto contra protozoários intracelulares, como a leishmania, reside na capacidade de atravessar bicamadas lipídicas e destruir o parasito sem afetar a célula hospedeira. A pentamidina, medicamento de referência apresentou alta atividade frente a formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, foram observados 100% de eliminação de macrófagos infectados a partir de 48 h pós-tratamento. No entanto, a toxicidade da pentamidina frente aos macrófagos a torna uma segunda opção, sendo usada quando o tratamento com compostos de antimônio não é eficaz (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRIGUEZ, 2001).

Os macrófagos infectados tratados com alcalóide liriodenina e com extratos orgânicos *A. mucosa* foram ativos frente a forma amastigota de *L. amazonensis*, sendo observado redução no número de macrófagos infectados e no número de amastigotas intracelulares. A análise da ação do alcalóide liriodenina e do extrato diclorometânico das folhas na interação parasito-célula hospedeira, através de microscopia óptica de campo claro, revelou que ambos mantiveram sua

atividade até 96 h pós-tratamento, reduzindo a taxa de infecção. Contudo analisando a correlação taxa de infecção e carga parasitária, somente o alcalóide liriodenina mantém sua atividade até 96 h pós-tratamento. Avaliando os outros extratos a partir de 48 h pós-tratamento é observado um aumento tanto na taxa de macrófagos infectados quanto na carga parasitária. A observação do desenvolvimento da infecção nos macrófagos e da propagação do patógeno busca compreender o comportamento das amostras, estudos anteriores demonstraram os mecanismos de ação dos alcalóides. Founet e colaboradores (2000) observaram a inibição de uma enzima antioxidante essencial da *Leishmania*, trypanotiona reductase, por alcalóides bisbenzylisoquinoline. Braga e colaboradores (2007) afirmaram que os alcalóides são capazes de intercalar com DNA. Assim, é possível que o alcalóide liriodenina possa ser o responsável pela atividade leishmanicida observada.

Os macrófagos atuam na infecção como hospedeiras do parasito quando quiescentes, mas também como células efetoras na eliminação do parasito após a sua ativação (HERWALDT, 1999). A principal estratégia de defesa dos macrófagos contra as leishmânias é a fagocitose, na qual os macrófagos interiorizam o parasito e o destroem pela produção de ERO e pela acidificação do fagolisossoma (CUNNINGHAM, 2002). Estudos realizados em modelos experimentais observaram esse processo após a fagocitose, fazendo parte do arsenal microbicida utilizado pelos macrófagos para a defesa contra a leishmânia (GANTT *et al.*, 2001). Entretanto a ativação destes mecanismos depende da fase de crescimento do parasita utilizado para infecção. As promastigotas são mais susceptíveis à morte, devido ao consumo de oxigênio nos macrófagos, enquanto que as formas metacíclicas e amastigotas, não o são (BOGDAN *et al.*, 1990).

A produção de NO, é uma via de fundamental importância para os macrófagos executarem sua função como células efetoras nos processos de defesa do organismo, e é a

principal molécula de destruição intracelular do parasita. Contudo esta atividade leva mais tempo para se iniciar, em comparação a via de produção de H_2O_2 , devido a necessidade de expressão da enzima iNOS, que não é expressa em grande quantidade em macrófagos não ativados (KORHONEN *et al.*, 2005). O aumento na produção de NO ocorre frente a diferentes estímulos, especificamente em relação à Leishmaniose, macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com citocinas como IFN- γ em presença de LPS, induzem a expressão de iNOS, liberando grandes quantidades de NO que destroem o parasito eficientemente. A produção de NO permanece por longos períodos de tempo e os macrófagos utilizam esta via para eliminar *Leishmania* spp. fagocitadas (BOGDAN, 2001; KORHONEN *et al.*, 2005; ROMÃO *et al.*, 2006).

A atividade do alcalóide lirioidenina e dos extratos orgânicos *A. mucosa* frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* não é indicativo de ativação dos mecanismos de produção de H_2O_2 e NO pelos macrófagos. Os sinais que estimulam os mecanismos oxidativos são independentes, através dos resultados analisados presume-se que o alcalóide lirioidenina e os extratos inibem a NO sintase, entretanto são capazes de interferir na via de produção de H_2O_2 , possuindo propriedades imunoestimulantes, aumentando a produção de H_2O_2 e outros intermediários reativos do O_2 . É possível que o efeito inibitório em amastigotas seja devido a uma ação direta das amostras no parasito, e não a uma ativação do metabolismo oxidativo de nitrogênio da célula hospedeira, uma vez que a produção de NO por macrófagos, estimulados com IFN- γ e LPS não foi ativada, o que é confirmado pelo índice de seletividade das amostras contra o parasita.

O NO tem um duplo papel no processo inflamatório, secretado em altos níveis por macrófagos ativados é importante na defesa do organismo. Por outro lado, os efeitos pró-

inflamatórios do NO parecem ser mediados pela sua produção exagerada e estão relacionados a várias doenças como o choque séptico, doenças auto-imunes, arteriosclerose (MONCADA, 1991). Por isso, atualmente é um mediador que pode exercer efeitos benéficos e prejudiciais dependendo do contexto patofisiológico (CIRINO *et al.*, 2002).

Considerando os resultados das atividades do alcalóide liriodenina e dos extratos orgânicos *A. mucosa in vitro*, os extratos diclorometânico e hexânico das folhas de *A. mucosa* foram selecionados para avaliação em modelos *in vivo*. Modelos *in vivo* de infecções experimentais com diferentes linhagens de camundongos têm sido utilizados, para um melhor entendimento de infecções humanas e mecanismos imunológicos e/ou genéticos de resistência frente a parasitas intracelulares como *Leishmania*. O gênero dos animais tem influência sobre a resposta imunológica resultante frente à infecção, inclusive com diferenças na resposta de acordo com a espécie de leishmânia empregada na infecção (MOCK & NACY, 1988; ROBERTS *et al.*, 2001; TRAVI *et al.*, 2002). Foram então utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c infectados com *L. amazonensis*, pois esses são suscetíveis à infecção, quando infectados apresentam doença progressiva e visceralizante (SCOTT & SCHARTON, 1994; FONSECA *et al.*, 2003).

Os camundongos infectados e tratados com os extratos diclorometânico e hexânico das folhas de *A. mucosa* apresentaram uma diminuição de peso corporal. Esses resultados suscitam a hipótese de que os extratos provocaram uma diminuição do metabolismo geral do organismo.

As lesões cutâneas causadas por *Leishmania* spp., nas fases iniciais da infecção, envolvem reações inflamatórias, com participação de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e, em muitos casos, reações granulomatosas, drogas com potencial anti-inflamatório podem ajudar na cicatrização das lesões (MUNGANTIWAR *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2002). Os extratos

diclorometânico e hexânico das folhas foram eficazes em reduzir a lesão cutânea na vigência do tratamento tanto na aplicação tópica quanto intraperitoneal. Os animais tratados com extrato diclorometânico das folhas aplicação intraperitoneal e tratados com as pomadas a base de extrato diclorometânico e hexânico das folhas foram capazes de conter o desenvolvimento da lesão cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* até a vigência do tratamento, perdendo a sua ação pós-tratamento. Esses resultados suscitam a hipótese de que o extrato diclorometânico das folhas em aplicação intraperitoneal pode ser convertido em metabólitos inativos ou é neutralizado.

Todavia, independentemente do modo de ação, a aplicação intraperitoneal do extrato hexânico das folhas foi capaz de conter o desenvolvimento da lesão cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, no pós-tratamento. Esses resultados suscitam a hipótese de que a atividade do extrato hexânico das folhas na aplicação intraperitoneal pode não estar associado majoritariamente com uma ação direta sobre o parasito, mas sim com uma atividade anti-inflamatória importante, que diminui os danos teciduais causados pelo sistema imune em resposta à infecção. Esta ação anti-inflamatória, talvez seja intensificada pelo fato do extrato hexânico das folhas apresentar potencial de inibição da produção de NO em macrófagos ativados, pois altos níveis desse metabólito, que deveria ser tóxico apenas para microorganismos, parasitos ou células tumorais, podem também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes (GANJU *et al.*, 2003).

Uma planta pode conter muitos metabólitos secundários, mas apenas os compostos que estão em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica, mas analisar os compostos ativos é uma tarefa mais complexa e longa, pois geralmente os compostos minoritários estão entre os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO &

YUNES, 1998). Embora os metabólitos secundários mais comuns da família Annonaceae sejam as acetogeninas e alcalóides, alguns apresentando excelente atividade leishmanicida (FAGUNDES *et al.*, 2005; OSORIO *et al.*, 2006; SERNA & CARDONA, 2006; COSTA *et al.*, 2006), é indispensável analisar a potencia das frações e das substâncias puras em relação a sua concentração, a partir desta avaliação podemos predizer se o principal componente químico responsável pela atividade biológica observada foi realmente determinado.

Através de cromatografia de camada delgada preparativa foram isolados, a partir extrato diclorometano das folhas de *A. mucosa*, os alcalóides liriodenina e atherospermidina identificados através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O alcaloide liriodenina, isolado anteriormente da espécie *A. mucosa* (sinonímia *Rollinia mucosa*) (CAETANO & DADOUN, 1987), é comumente encontrado em espécies da família Annonaceae. Estudos relatam à atividade do alcalóide liriodenina frente a formas promastigotas de *Leishmania* spp sendo isolado de *A. spinescens* (QUEIROZ *et al.*, 1996); *A. emarginata* (sinonímia *Rollinia emarginata*) (FÉVRIER *et al.*, 1999); *Unonopsis buchtienii* (WAECHTER *et al.*, 1999) e *A. foetida* (COSTA *et al.*, 2006). No presente estudo o alcalóide liriodenina apresentou atividade frente as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses* *in vitro*. O alcalóide atherospermidina foi isolado anteriormente nas espécies *Polyalthia serica* (BRASH & SNEDEN 1983); *Guatteria foliosa* (MAHIOU, *et al.*, 1994); *Artabotrys zeylanicus* (WIJERATNE *et al.*, 1996); *Oxandra longipetala* (ORTIZ *et al.*, 2007) e *Guatteriopsis friesiana* (COSTA *et al.*, 2007), sendo este trabalho, o primeiro registro do seu isolamento em *A. mucosa*.

O mecanismo de ação dos alcalóides não está totalmente esclarecido, porém estudos anteriores demonstraram os mecanismos de ação a partir da relação estrutura-atividade. A relação estrutura-atividade dos aporfinóides geralmente envolve o padrão de substituição e a planaridade

da molécula com relação aos demais alcalóides aporfinóides. Fournet e colaboradores (2000) observaram que alcalóides inibem uma enzima antioxidante essencial na *Leishmania*, a tripanotiona redutase. A inibição da DNA topoisomerase II, e a interferência com as enzimas de manipulação do DNA, é certamente um mecanismo de ação comum para uma variedade de aporfinóides (STÉVIGNY, 2005). Este fato também é confirmado por Braga e colaboradores (2007) que observaram sobre o mecanismo de ação de alguns alcalóides, sendo atribuído à sua capacidade para intercalar com o DNA. Por outro lado, Goeren e colaboradores (2003) ao avaliar a atividade de alguns aporfinóides frente ao DNA observaram que o alcalóide liriodenina não possuía propriedade seletiva de danificar o DNA.

Os principais tratamentos medicamentosos recomendados para Leishmaniose Tegumentar Americana foram introduzidos mais de 50 anos atrás. Atualmente o tratamento é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito (RATH *et al.*, 2003; CROFT & COOMBS, 2003). A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a conclusão do tratamento (CARVALHO & FERREIRA, 2001; PAULA *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2006).

Considerando as dificuldades de tratamento, a ausência de vacinas e os resultados obtidos referentes à atividade leishmanicida da espécie *A. mucosa*, pode ser uma fonte promissora de substâncias ativas, contribuindo para o avanço na busca de novas drogas terapêuticas para Leishmaniose Tegumentar Americana.

7. CONCLUSÕES

1. Produtos naturais isolados de Annonaceas podem ser uma fonte de novas drogas com alta atividade e baixa toxicidade proporcionando alternativas na substituição de drogas sintéticas no tratamento da leishmaniose sem os indesejáveis efeitos colaterais.
2. Houve correlação entre os modelos *in vitro* e *in vivo* para a avaliação do efeito leishmanicida dos extratos diclorometano e hexânico das folhas de *A. mucosa*. Esses apresentaram atividade leishmanicida frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis in vitro*, foram capazes de interferir nos mecanismos de atuação dos macrófagos e *in vivo* foram eficazes no tratamento da lesão cutânea tanto na análise clínica quanto parasitológica.
3. É necessário que, além dos componentes já isolados e identificados, sejam isolados outros componentes dos extratos diclorometano e hexânico das folhas de *A. mucosa* para que se possa testá-los separadamente a fim de se determinar aquele que apresenta atividade mais efetiva.

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: *Elsevier* **2005**.
- Afonso, L.; Borges, V.M.; Cruz, H.; Ribeiro-Gomes, F.L.; Dos Reis, G.A.; Dutra, N.A.; Clarêncio, J.; Oliveira, C.I.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; Brodskyn, C.I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J.Leukoc Biol.* **2008**, *84*: 389-96.
- Akendengue, B.; F.; Loiseau, P.M.; Bories, C.; Ngou-Milama, E.; Laurens, A.; Hocquemiller, R. Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. *Phytochemistry* **2002**, *59*(8): 885-888.
- Akendengue, B.; Ngou-Milama, E.; Laurens, A.; Hocquemiller, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* **1999**, *6*(1): 3-8.
- Alali, F.Q.; Liu, X.X.; McLaughlin, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*(3): 504-540.
- Alencar, D.C.; Silva, F.M.A.; Pinheiro, M.L.B.; Souza, A.D.L.S.; Costa, E.V.; Barison, A.; Campos, F.R. Perfil alcaloídico das folhas e galhos finos de *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries por espectrometria de massa (IES-EM/EM). *34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)* **2011**, T0252-1.
- Alvarez-Gonzalez, I.; García-Aguirre, K.K.; Martino-Roaro, M.; Zepeda-Vallejo, G.; Madrigal-Bujaidar, E. Anticarcinogenic and genotoxic effects produced by acetogenins isolated from *Annona muricata*. *Toxicology Letters* **2008**, *118*, S228.
- Alves, T.M.A.; Silva, A.F.; Brandão, M.; Grandi, T.S.M.; Smânia, E.F.; Smânia Jr., A.; Zani, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95*(3): 367-373.
- Amorozo, M.C.M. Uso e Diversidade de Plantas Mediciniais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil, *Acta Botânica Brasileira* **2002**, *16*(2): 189-203.
- Aniszewski, T. (Ed). *Alkaloids – Secrets of Life*. *Hardbound, Finland* **2007**, 316 pp.
- Araújo Filho, N.A. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento na Amazônia. *Acta Amazônica* **1981**, *11*(1): 187-189.
- Ashford, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*: 1269-1281.
- Barata, L.E.S.; Santos, L.S.; Ferri, P.H.; Phillipson, J.D.; Paine, A.; Croft, S.L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* **2000**, *55*(6): 589-595.

- Barreto, A.C.; Cuba, C.C.; Marsden, P.D.; Vexenat, J.A.; De Belder, M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia, Brasil. I. Leishmaniose humana. *Boletín de la Oficina Panamericana de Salud* **1981**, *90*: 415-424.
- Basano, S.A.; Camargo, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **2004**, *7*(3): 328-337.
- Beil, W.; Meinardus-Hager, G.; Neugebauer, D.C.; Sorg, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J. Leuk Biol.* **1992**, *52*: 135-142.
- Bender, J.G.; McPhail, L.C.; Van Epps, D.E. Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the respiratory burst enzyme. *J. Immunol.* **1983**, *130*(5): 2316-2323.
- Berg, M.E. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal da Amazônia brasileira. 206f. Tese - Curso de pós-graduação em Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, **1978**.
- Betancur-Galvis, L.A.; Saez, J.; Granados, H.; Salazar, A.; Ossa, J.E. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1999**, *94*(4): 531-535.
- Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **2004**, *40*: 845-859.
- Bezerra, J.L.; Costa, G.C.; Lopes, T.C.; Carvalho, I.C.D.S.; Patrício, F.J.; Sousa, S.M.; Amaral, F.M.M.; Rebelo, J.M.; Guerra, R.N.M.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2006**, *16*: 631-637.
- Blair, S.; Correa, A.; Madrigal, B.; Zuluaga, C.B.; Franco, H.D. Plantas antimaláricas, una revisión bibliográfica. *Medellín: Ed Universidad de Antioquia*, **1991**, 214 p.
- Blank, C; Fuchs, H; Rappersberger, K; Rölinghoff, M; Moll, H. Parasitism of epidermal langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* **1993**, *167*: 418-425.
- Blumberg, P.M. *In vitro* studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1. *Crit. Rev. Toxicol.* **1980**, *8*(2): 153-197.
- Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*(10): 907-916.
- Bogdan, C.; Gessner, A.; Rölinghoff, M. Cytokines in Leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology* **1993**, *189*: 356-396.
- Bogdan, C.; Rölinghoff, M.; Solbach, W. Evasion strategies of *leishmania* parasites. *Parasitology Today* **1990**, *6*(6): 183-187.
- Bories, C.; Loiseau, P.; Cortes, D.; Myint, S.H.; Hocquemiller, R.; Gayral, P.; Cave, A.; Laurens, A. Antiparasitic Activity of *Annona muricata* and *Annona cherimola* Seeds. *Planta Medica* **1991**, *57*(5): 434-436.
- Botsaris, A.S. Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras. **2002**, 2ed. p. 37-41.
- Boyom, F.F.; Ngouana, V.; Zollo, P.H.A.; Menut, C.; Bessiere, J.M.; Gut, J.; Rosenthal, P.J. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five Annonaceae species growing in Cameroon. *Flavour Fragrance Journal* **1996**, *11*(6): 333-338.
- Braga, F.G.; Bouzada, M.L.M.; Fabri, R.L.; Matos, M.O.; Moreira, F.O.; Scio, E.; Coimbra, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in tradicional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *111*(2): 396 - 402.
- Brash, R.M.; Sneden, A.T. Oxoaporphine Alkaloids from *P.serica* *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*(3): 437-437
- Brummitt, R.K. Vascular Plant Families and Genera. *Royal Botanic Gardens, Kew* **1992**, 491p.

- Burke, B.; Lewis, C.E. The Macrophage. 2. ed. *New York: Oxford University Press, 2002.*
- Caetano, L.C.; Dadoun, H. Pallidine and Aporphinoid Alkaloids from *Annona mucosa*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*(2): 330-330
- Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*(2): 179-189.
- Camacho, M.D.R.; Phillipson, J.D.; Croft, S.L.; Solis, P.N.; Marshall, S.J.; Ghazanfar, S. A Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, *89*(2-3): 185-191.
- Campos, F.R.; Batista, R.L.; Batista, C.L.; Costa, E.V.; Barison, A.; Santos, A.G.; Pinheiro, M.L.B. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2008**, *36*: 804–806.
- Carvalho, J.E.M.; Moraes, I.N.; Ferreira, A.S.; Gomes, R.L.C.; Dalston, M.O.; Silva, J.J.P. Study of bronchoalveolar lavage in leptospirosis patients with pulmonary involvement. *J. Bras. Pneumol.* **2004**, *30*(2): 134-139.
- Carvalho, P.B.; Arribas, M.A.G.; Ferreira, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2000**, *36*(1): 69-96.
- Carvalho, P.B.; Ferreira, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* **2001**, *72*: 599-618.
- Cavé, A.; Cortes, D.; Figadère, A.; Laurens, A.; Pettit, G.R. Acetogenins from *Annonaceae*, p. 81-288; In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; HERZ, W.; KIRBY, G. W.; MOORE, R. E.; STEGLICH, W.; TAMM, C. Eds.; *Springer-Verlag: Vienna 1997*, *70*, 330 p.
- Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para a otimização da atividade. *Química nova* **1998**, *21*(1): 99-105.
- Centro Nordestino de Informações sobre Plantas – CNIP. Plantas medicinais do Ceará. *Annona sericea*. Desenvolvido pelo Prof.º Francisco José de Abreu Matos, **2002**. Disponível em: <http://www.umbuzeiro.cnip.org.br/db/medic/taxa/201.html> Acesso em: 18/12/2011.
- Chan-Bacab, M.J.; Peña-Rodriguez, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*(6): 674 - 88.
- Chang, K.P. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science* **1980**, *209*: 1240-1242.
- Chen, Y.Y.; Chang, F.R.; Wu, Y.C. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Annona mucosa*. *Journal of Natural Products* **1996**, *59*(9): 904-906.
- Cirino, G.; Santagada, V.; Caliendo, G. The nitric oxide related therapeutic phenomenon: a challenging task. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*(3): 233-239.
- Coelho, M.B.; Souza, I.A.; Freire, M.G.M.; Marangoni, S.; Antunes, E.; Macedo, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. *Toxicon* **2006**, *48*(5): 529-535.
- Convit, J.; Ulrich, M.; Polegre, M.A.; Avila, A.; Rodriguez, N.; Mazzedo, M.I.; Blanco, B. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus calmett-guerin - Preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2004**, *99*(1): 57-62.
- Correa, J.E.; Rios, C.H.; Castillo, A.R.; Romero, L.I.; Ortega-Barría, E.; Coley, P.D.; Kursar, T.A.; Heller, M.V.; Gerwick, W.H.; Rios, L.C. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Medica* **2006**, *72*(3): 270-272.
- Corrêa, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, *Ministério da Agricultura/IBDF 4, 1969.*

- Costa Filho, A.V.; Lucas, Í.C.; Sampaio, R.N.R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2008**, *41*(4): 424-427.
- Costa, E.V.; Maia, B.H.L.N.S.; Marques, F.A.; Pinheiro, M.L.B.P. Alcalóides das folhas de *Guatterioopsis friesiana* (Annonaceae). 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química **2007**.
- Costa, E.V.; Pinheiro, M.L.B.; Silva, J.R.A.; Maia, B.H.L.N.S.; Duarte, M.C.T.; Amaral, A.C.F.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova* **2009**, *32*(1): 78-81.
- Costa, E.V.; Pinheiro, M.L.B.; Xavier, C.M.; Silva, J.R.A.; Amaral, A.C.F.; Souza, A.D.L.; Barison, A.; Campos, F.R.; Ferreira, A.G.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L.P.A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products* **2006**, *69*(2): 292-294.
- Costa, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia* **2005**, *75*(1): 3-17.
- Costa, J.M.L. Estudo clínico-epidemiológico de um surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra-Bahia. 186 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília (UNB), Brasília, **1986**.
- Costa, J.M.L.; Vale, K.C.; França, F.; Saldanha, A.C.R.; Silva, J.O.; Lago, E.L.; Marsden, P.D.; Magalhães, A.V.; Silva, C.M.P.; Netto, A.S.; Galvão, C.E.S. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1990**, *23*(4): 205-208.
- Costa, E.V.; Pinheiro, M.L.B.; Souza, A.D.L.; Barison, A.; Campos, F.R.; Valdez, R.H.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules* **2011**, *16*, 9714-9720.
- Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* **2003**, *19*(11): 502-508.
- Cunningham, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental Molecular Pathology*. **2002**, *72*: 132-141.
- Cysne-Finkelstein, L.; Temporal, R.M.; Alves, F.A.; Leon, L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **1998**, *89*(1): 58-62.
- Degli Esposti, M.; Ghelli, A.; Ratta, M.; Cortés, D.; Estornell, E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *Biochem J.* **1994**, *301*: 161-167.
- Delorenzi, J.C.; Attias, M.; Gattass, C.; Andrade, M.; Rezende, C.; Da Cunha, A.; Henriques, A.; Bou-Habib, D.; Saraiva, E. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, *45*: 1349-1354.
- Dourado, M.I.C.E.; Noronha, C.V.; Alcântara, N.; Ichihara, M.Y.; Loureiro, S. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública* **1989**, *23*(1): 2-8.
- Dujardin, J.C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology* **2006**, *22*(1): 4-6.
- Dusse, L.M.S.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. Nitric oxide revision. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2003**, *39*(4): 343-350.

- Elisabetsky, E.; Wannmacher, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *J. Ethnopharmacol* **1993**, 38(2-3): 137-143.
- Fagundes, F.A.; Oliveira, L.B.; Cunha, L.C.; Valadares, M.C. *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. *Revista Eletrônica de Farmácia* **2005**, 2(1): 24-29.
- Falcão, M.A.; Lleras, E.; Kerr, W.E.; Carreira, L.M.M. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do biriba (*Annona mucosa* (Jacq.) Baill.). *Acta Amazônica* **1981**, 11(2): 297-306.
- Farmacopéia Brasileira (FB). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ª ed. *Brasília: ANVISA* **2010**, v.2. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm> Acessado em: 18/07/2011.
- Ferreira, L.; Perestrelo, R.; Camara, J.S. Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry detection. *Talanta* **2009**, 77(3): 1087-1096.
- Février, A.; Ferreira, M.E.; Fournet, A.; Yaluff, G.; Inchausti, A.; Arias, A.R.; Hocquemiller, R.; Waechter, A.S. Acetogenins and other compounds from *Annona emarginata* and their antiprotozoal activities. *Planta Medica* **1999**, 65(1): 47-49.
- Fonseca, S.G.; Romão, P.R.; Figueiredo, F.; Morais, R.H.; Lima, H.C.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.* **2003**, 33: 2297-2306.
- Fournet, A.; Barrios, A.A.; Muñoz, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **1994**, 41(1-2): 19-37.
- Fournet, A.; Barrios, A.A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, C.A. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Annals of Tropical Medicine Parasitology* **1992**, 43(4): 219-222.
- Fournet, A.; Muñoz, V.; Manjon, A.M.; Angelo, A.; Hocquemiller, R.; Cortes, D.; Cave, A.; Bruneton, J. Activite antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoleïques. I: activite *in vitro* sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*. *Journal of Ethnopharmacology* **1988**, 24(1): 327-35.
- Fournet, A.; Rojas de Arias, A.; Ferreira, M.E.; Nakayama, H.; Torres de Ortiz, S.; Schinini, A.; Samudio, M.; Vera de Bilbao, N.; Lavault, M.; Bonte, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, 13(3): 189-195.
- Fumarola, L.; Spinelli, R.; Brandonisio, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *leishmania* spp. *Research in Microbiology* **2004**, 155(4): 244-230.
- Fundação Nacional de Saúde (FNS). Leishmaniose Tegumentar Americana: Vigilância e Monitoramento da Leishmaniose Tegumentar em Unidades Territoriais-Brasil, 1994 - 2001. Boletim Epidemiológico, Ano 02, Nº 05, 13/12/2002. *Ministério da Saúde, Brasília*, **2002**. Disponível em: <www.funasa.gov.br> Acesso em: 06 de junho de 2009.
- Ganju, L.; Karan, D.; Chanda, S.; Srivastava, K.K.; Sawhney, R.C.; Selvamurthy, W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomed Pharmacother* **2003**, 57(7): 296-300.
- Gantt, K.R.; Goldman, T.L.; McCormick, M.L.; Miller, M.A.; Jeronimo, S.M.B.; Nascimento, E.T.; Britigan, B.E.; Wilson, M.E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* **2001**, 167: 893-901.
- Garcia, A.L.; Kindt, A.; Quispe-Tintaya, K.W.; Bermudez, H.; Llanos, A.; Arevalo, J.; Bañuls, A.L.; De Doncker, S.; Le Ray, D.; Dujardin, J.C. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol* **2005**, 5: 109-116.

- Giaimis, J.; Lombard, Y.; Makaya-Kumba, M.; Fonteneau, P.; Poindron, P. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *Journal of Immunological Methods* **1992**, *154*(2): 185-193.
- Goeren, A.C.; Zhou, B.N.; Kingston, D.G.I. Cytotoxic and DNA damaging activity of some aporphine alkaloids from *Stephania dinklagei*. *Planta Med.* **2003**, *69*(9): 867-868.
- Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2003**, *36*(1): 71-80.
- González-Coloma, A.; Guadano, A.; Inês, C.; Martínez-Díaz, R.; Cortez, D. Selective Action of Acetogenin Mitochondrial Complex I Inhibitors. *Z Naturforsch* **2002**, *57*: 1028-1034.
- Gordon, S.; Unkeless, J.C.; Cohn, Z.A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: evidence for a two stage process. *Journal of Experimental Medicine* **1974**, *140*(4): 995-1010.
- Gossage, S.M.; Rogers, M.E.; Bates, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology* **2003**, *3*: 1027-1034.
- Grandic, S.R.; Fourneau, C.; Laurens, A.; Bories, C.; Hocquemiller, R.; Loiseau, P.M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from *Annonaceae*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2004**, *58*(6-7): 388-392.
- Green, L.G.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem. New York* **1982**, *126*:131-138.
- Grimaldi, G.Jr.; Soares, M.J.; Moriearty, P.L. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **1984**, *6*: 397-408.
- Grimaldi, G.Jr.; Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *ClinMicrobiol Rev* **1993**, *6*: 230-250.
- Guinaudeau, H.J.; Leboeuf, M.; Cavé, A. Aporphinoid alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*(8): 1033 - 1135.
- Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *Faseb J.* **1987**, *1*(5): 358-364.
- Halliwell, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*(9): 509-515.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals, 'reactive species' and toxicology. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. *Oxford University Press, New York* **1999**, pp. 544-616.
- Handman, E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* **1999**, *44*: 1-39
- Handman, E. *Leishmania* vaccines: Old and new. *Parasitology Today* **1997**, *13*(6): 236-238.
- Handman, E.; Ceredig, R.; Mitchell, G.F. Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Aust J Exp Biol Med Sci* **1979**, *75*: 9-29.
- Henriques, A.T.; Kerber, V.A.; Moreno, P.R.H. Alcalóides, generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentez, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 1 ed., *Ed. Universidade/UFRGS* **1999**, pp. 641-655.
- Henriques, C.; Souza, W. Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *leishmania amazonensis* - containing parasitophorous vacule. *Parasitology Research* **2000**, *86*(3): 215-225.
- Hepburn, N.C. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology* **2000**, *25*(5): 363-370.
- Herwaldt, B.L. Leishmaniasis. *Lancet.* **1999**, *354*: 1191-1199.

- Hocquemiller, R., Cortes, D.; Arango, G.J.; Myint, S.H.; Cave, A. Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire. *Journal of Natural Products* **1991**, *54*(2): 445-452.
- Hueb, M.; Barros, A.B.; Pazin, G.V. Avaliação da Eficácia do Leishvacin no tratamento da leishmaniose cutânea. *Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2007**, *40*(I): 115-115.
- Iwu, M.M.; Jackson, J.E.; Schuster, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today* **1994**, *10*: 65-68.
- Jaramillo, M.C.; Arango, G.J.; González, M.C.; Robledo, S.M.; Velez, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* **2000**, *71*(2): 183-186.
- John, B.; Hunter, C.A. Neutrophil soldiers or trojan horses? *Science*. **2008**, *321*: 917-918.
- Kam, T.S.; Sim, K.M.; Koyano, T.; Toyoshima, M.; Komiyama, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffi thii*. *Phytochemistry* **1999**, *50*(1): 75-79.
- Kapil, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta Medica* **1993**, *59*(5): 474.
- Kar, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* **1995**, *21*: 123-152.
- Kedzierski, L.; Sakthianandeswaren, A.; Curtis, J.M.; Andrews, P.C.; Junk, P.C.; Kedzierska, K. Leishmaniasis: Current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*(5): 599-614.
- Kemp, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS* **1997**, *Suppl 68*: 1-33.
- Kiechle, F. L.; Malinski, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Clin. Chem. Baltimore* **1993**, *100*(5): 567-573.
- Killick-Kendrick, R.; Molyneux, D.H.; Ashford, R.W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1974**, *68*(4): 269.
- Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy*. **2005**, *4*: 471-479.
- Lainson, R. Epidemiologia e ecologia de leishmaniose tegumentar na Amazônia. *Hiléia Médica* **1981**, *3*(1): 35-40.
- Lainson, R.; Shaw, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature* **1978**, *273*: 596-600.
- Langhans, W. Bacterial products and the control of ingestive behavior: clinical implications. *Nutrition* **1996**, *12*(5): 303-315.
- Le Boeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumix, P.K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. The Phitochemistry of Annonaceae. *Phytochemistry* **1982**, *21*(12): 2783 pp.
- Le Cointe, P. Amazônia brasileira III. Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimatadas). 2 ed, São Paulo, *Ed. Nacional* **1947**, 506 p.
- Liaw, C.C.; Chang, F.R.; Chen, Y.Y.; Chiu, F.F.; Wu, M.J.; Wu, Y.C. New annonaceous acetogenins from *Annona mucosa* Baill. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*: 161-1617.
- Liese, J.; Schleicher, U.; Bogdan, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* **2008**, *213*: 377-387.
- Lima, H.C.; Bleyenbergh, J.A.; Titus, R.G. A Simple Method for Quantifying *Leishmania* in Tissues of Infected Animals. *Parasitology Today* **1997**, *13*(2): 80-82.
- Lobão, A.Q.; Araújo, D.S.D.; Kurts, B.C. Annonaceae das restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* **2005**, *56*(87): 85-96.

- Maas, P.J.M.; Kamer, H.M.; Junikka, L.; Mello-Silva, R.; Rainer, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia* **2001**, 52(80): 65-98.
- Maas, P.J.M.; Maas, H.; Miralha, J.M.S. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae, *Rodriguésia* **2007**, 58(3): 617-662.
- Maas, P.J.M.; Rainer, H.; Lobão, A. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **2010**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB117272>> Acessado em : 14/05/2012.
- Machado, P.; Araújo, C.; Silva, A.T.; Almeida, R.P.; D'Oliveira, A.Jr.; Bittencourt, A. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of ulcer. *Clin Infect Dis.* **2002**, 34(12): 69-73.
- MacMicking, J.; Qiao-Wen Xie; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, 15: 323-350.
- Mahiou, V.; Roblot, F.; Fournet, A.; Hocquemiller, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). *Phytochemistry* **2000**, 54(7): 709-716.
- Mahiou, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cave, A.; Rojas de Arias, A.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Fournet, A. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *Journal of Natural Products* **1994**, 57(7): 890-895.
- Maioli, T.U.; Takane, E.; Arantes, R.M.; Fietto, J.L.; Afonso, L.C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res.* **2004**, 94: 207-212.
- Manica, I. Frutas nativas, silvestres e exóticas 1. Técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biriba, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba. *Porto Alegre: Cinco Continentes* **2000**, 1: 327 p.
- Manson-Bahr P.E. Diagnosis. In: *The leishmaniasis*. London, Peters W. & Killick-Kendrick R. **1987**, 2: 703-728.
- Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell, Cambridge* **1994**, 78(6): 927-930.
- Marletta, M.A.; Yoon, P.S.; Iyengar, R.; Leaf, C.D.; Wishnok, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry, Easton* **1988**, 27(24): 8706-8711.
- Marsden, P.D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1994**, 89(3): 485-487.
- Marsden, P.D.; Tada, M.S.; Barreto, A.C.; Cuba, C.C. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1984**, 78: 561-562.
- Marzochi, M.C.A.; Marzochi, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging Anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública* **1994**, 10(2): 359-375.
- Maurer, M.; Kostka, S.L.; Siebenhaar, F.; Moelle, K.; Metz, M.; Knop, J.; Von Stebut, E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *The FASEB Journal* **2006**, 20: 2460-2467.
- Mayrink, W.; Botelho, A.C.C.; Magalhães, P.A.; Batista, S.M.; Lima, A.O.; Genaro, O.; Costa, C.A.; Melo, M.N.; Michalick, M.S.M.; Williams, P.; Dias, M.; Caiaffa, W.T.; Nascimento, E.; Machado-Coelho, G.L.L. Imunoterapia, imunoquimioterapia e quimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2006**, 39(1): 14-21.
- Mello-Silva, R.; Pontes, A.F. Annonaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Boletim Botânico Univ. São Paulo* **2005**, 23: 71-84.

- Mesquita, M.L.; *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*(7): 783-787.
- Michalick, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: Neves, D.P.; Elo, A.L.; Genaro, O.; Linardi, P.M. *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu **2003**, 7: 41-46.
- Ministério da Saúde (MS). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde **2007**, 180 p. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf> Acessado em: 11/01/2009.
- Ministério da Saúde (MS). *Aspectos epidemiológicos* **2010** Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560> Acessado em: 26/05/2012.
- Mock B.A.; Nacy, C.A. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infect Immun.* **1988**, *56*: 3316-3319.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev., Baltimore* **1991**, *43*(2): 109-142.
- Montenegro, H., Gutiérrez, M.; Romero, L.I.; Ortega-Barria, E.; Capson, T.L.; Rios, L.C. Aporphine alkaloids from *Gutteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta Medicine* **2003**, *69*(7): 677-679.
- Monzote, L.; Garcia, M.; Montalvo, A.M.; SCULL, R.; Miranda, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2010**, *105*(2): 168-173.
- Moreira, R.C.R.; Costa, J.M.L.; Saldanha, A.C.; Silva, A.R. Projeto Buriticupu Maranhão II. Plantas usadas como terapêutica da leishmaniose tegumentar americana na região de Buriticupu-Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1998**, *31*(I): T248, 126.
- Moreira, R.C.R.; Rebêlo, J.M.M.; Gama, M.E.A.; Costa, J.M.L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* **2002**, *18*(1): 187-195.
- Motta, J.O.C. Estudo comparativo da resposta imunológica e clínica entre a anfotericina B lipossomal e o N-metil glucamina em pacientes com a forma localizada da leishmaniose tegumentar americana (LTA). **2006**. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília – DF.
- Muller, R.; Baker, J.R. *Medical Parasitology*. Gower Medical Publishing: London, **1990** 168p.
- Mungantiwar, A.A.; Nair, A.M.; Shinde, U.A.; Dikshit, V.J.; Saraf, M.N.; Thakur, V.S. Studies on the immunomodulatory effects of alkaloidal fraction. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *65*(2): 125-31.
- Murray, H.W.; Berman, J.D.; Davies, C.R.; Saravia, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **2005**, *366*(9496): 1561-1577.
- Nakamura, C.V.; Santos, A.O.; Vendrametto, M.C.; Luize, O.S.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A. G.; Ueda-Nakamura, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*(1): 61-66.
- Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*: 173-182.
- Nathan, C.; Xie, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*(19): 13725-13728.

- Netto, E.M.; Tada, M.S.; Golight, K.D.C.; Lago, E.; Barreto, A.C.; Marsden, P. Conceitos de uma população local a respeito da leishmaniose mucocutânea em uma área endêmica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1985**, *18*(1): 33-37.
- Niero, R.; Malheiros, A.; Bittencourt, C.M.S.; Biavatti, M.W.; Leite, S.N.; Cechinel Filho, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: Bresolin, T.M.B.; Cechinel Filho, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. *Itajaí: Univali* **2003**, 239p.
- Nunes, R.K. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense. **2008**. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Olivier, M.; Gregory, D.J.; Forget, G. Subversion mechanisms by which leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*(2): 293-305.
- Ordóñez-Gutiérrez, L.; Espada-Fernández, R.; Dea-Ayuela, M.A.; Torrado, J.J.; Bolás-Fernandez, F.; Alunda, J. *In vitro* effect of new formulation of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2007**, *30*(4): 325-329.
- Ortiz, A.A.; Cuca Suarez, L.E.; Patiño, G.S. Aporfinoides en hojas de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). *Scientia et Technica* **2007**, *33*: 19-22.
- Osorio, E.J.D.; Montoya, G.L.P.; Arango, G.J.A. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. *Vitae (Medellín)* **2006**, *13*(1): 61-84.
- Osorio, E.J.D.; Arango, G. J.A.; Jiménez, N.; Alzate, F.; Ruiz, G.; Gutiérrez, D.; Paco, M. A.; Giménez, A.; Robledo, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian *Annonaceae*. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *111*(3): 630-635.
- Passos, J.P.S. Padronização de métodos de produção de antígenos de montenegro. **2004**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Patz, J.A.; Graczyk, T.K.; Geller, N.; Vittor, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal Parasitology* **2000**, *30*(12-13): 1395-1405.
- Paula, C.D.R.; Sampaio, J.H.D.; Cardoso, D.R.; Sampaio, R.N.R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metilglucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2003**, *36*(3): 365-371.
- Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *Journal of Immunological Methods* **1980**, *38*(1-2): 161-170.
- Pick, E.; Mizel, D. Rapid microassay for the measurement of peroxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*. **1981**, *46*(2): 211-226.
- Prace, G.T.; Silva, M. Árvores de Manaus. Manaus: INPA, **1975**, 312p.
- Queiroz, E.F.; Roblot, F.; Cave, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *Journal Natural Products* **1996**, *59*: 438-440.
- Rainer, H. Manographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-HIL. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* **2007**, *108B*: 191-205
- Rath, S.; Trivelin, L.A.; Imbrunito, T.R.; Tomazela, D.M.; Jesús, M.N.; Marzal, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova* **2003**, *26*(4): 550-553.

- Raveth, J.; Aderem, A. Phagocytic cells. *Immunol Rev.* **2007**, 219:5-7.
- Reis, L.C.; Brito, M.E.F.; Souza, M.A.; Pereira, V.R.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical* **2006**, 35(2): 103-115.
- Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* **2007**, 7(9): 581-596.
- Revilla, J. Plantas úteis da Bacia Amazônica. *Manaus: INPA/SEBRAE*, **2002**. v.1.
- Roberts, C.W.; Walker, W.; Alexander, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* **2001**, 14: 476 - 88.
- Rocha, A.I.; Luz, A.I.R.; Rodrigues, W.A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. III – Annonaceae. *Acta Amazônica* **1981**, 11(3): 537 - 546.
- Rocha, L.G.; Almeida, J.R.G.S.; Macêdo, R.O.; Barbosa-Filho, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **2005**, 12(6-7): 514-535.
- Rodrigues, F.H.; Cardoso, S.R.A.; Gomes, M.A.B.; Beletti, M.E.; Rocha, A.; Guimarães, A.H.B.; Candeloro, I.; Souza, M.A. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Veterinary Parasitology* **2006**, 139(1-3): 37-46.
- 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*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2008**, 18: 350-355.
- Roitt, I.M.; Delves, P.T. Roitt's essential immunology. 9 ed. *London: Blackwell Science* **1997**. 476p
- Romão, P.R.; Tovar, J.; Fonseca, S.G.; Moraes, R.H.; Cruz, A.K.; Hothersall, J.S.; Noronha-Dutra, A.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Méd Biol Res.* **2006**, 39: 355-363.
- Roosmalen, M.G.M. Fruits of the guianan flora. *Wageningen: Utrecht University* **1985**. 483 p.
- Rossell, R.A.; Duran, R.J.; Rossel, O.; Rodrigues, A.M. Is leishmaniasis ever cured? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1992**, 86(3): 251-253.
- Ruiz, J.H.; Becker, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **2007**, 29: 671-678.
- Ruprecht, J.K.; Hui, Y.H.; McLaughlin, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. *Journal of Natural Products* **1990**, 53(2): 237-278.
- Russo, M.; Teixeira, H.C.; Marcondes, M.C.; Barbuto, J.A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Brazilian Journal Medicine Biology Research.* **1989**, 22(10): 1271-1273.
- Sacks, D.; Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* **2002**, 2: 845 - 858.
- Sacks, D.; Sher, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol* **2002**, 3: 1041-1047.
- Santos Pimenta, L.P.; Nascimento, F.C.; Assunção, A.C.S.; Oliveira, A. B.; Boaventura, M.A.D. Laurifolin, a novel acetogenin from *Annona laurifolia* leaves. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42(48): 8433-8434.
- Santos, A.G. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Annona impressivenia*, **2007**. 101p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais). Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM.

- Santos, A.G.; Pinheiro, M.L.B.; Silva, J.R.A.; Amaral, A.C.F.; Leon, L.L.; Machado, G.M.C. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Annona impressivenia*. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) **2006**, .
- Santos, L.P.; Boaventura, M.A.D.; Oliveira, A.B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofuranica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). *Química Nova* **1994**, *17*: 387-391.
- Saravia, N.G.; Holguin, A.F.; McMahon-Pratt, D.; Alessandro, D.A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania brasiliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg.* **1985**, *34*: 714-720.
- Satalaya, J.R.; Rojas J.U.; Ríos, B.; Grandez, M.; Rengifo, E.; Ruiz, G.; Gutierrez, D.; Gimenez, A.; Flores, N. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. *Biofarbo* **2009**, *17*(2): 23-31.
- Schmeda-Hirschmann, G.; Razmilic, I.; Sauvain, M.; Moretti, C.; Munoz, V. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and *jatrophone* from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Research* **1996**, *10*(5): 375-378.
- Schwikkard, S.; Heerden, F.R. Antimalarial activity of plant metabolites. *Natural Product Reports* **2002**, *19*(6): 675-692.
- Scott, P.; Farrel, J.P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol* **1998**, *70*: 60-80.
- Scott, P.; Scharon, T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. *Ann N Y Acad Sci.* **1994**, *730*: 84-92.
- Segal, A.W. How neutrophils kill microbes. *J. Innate Immun.* **2005**, *23*: 197-223.
- Segner, H.; *et al.* Cytotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line. *International Symposium Toxicity Assessment and on-line monitoring, Nova York* **1994**, *9*(4): 273-279.
- Serna, D.M.O.; Cardona, R.O. Bioactividad de la familia *Annonaceae*. *Revista Universidad de Caldas, Emnero.* **2006**, p.135-155.
- Shaw, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their applications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1994**, *89*(3): 471-478.
- Silva, D.B.; Matos, M.F.C.; Nakashita, S.T.; Misu, C. K.; Yoshida, N.C.; Carollo, C.A.; Fabri, J.R.; Miglio, H.S.; Siqueira, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de *Annonaceae*. *Quim Nova* **2007**, *30*: 1809-1812.
- Silva, D.G. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania spp.* E análise da atividade leishmanicida de chalconas. **2008**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina - SC.
- Silva, M.J. Avaliação do uso combinado do triterpeno lupano e glucantime na infecção por *Leishmania amazonensis in vitro*. **2009**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia – RO.
- Silva, T.M.A.; Aoyama, H.; Haun, M.; Ferreira, C.V. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. *RBCA, São Paulo* **2004**, *36*(4): 237-239.
- Silva-Jardim, I. Papel dos proteossomas na interação e desenvolvimento de *L. chagasi* em macrófagos murinos. **2001**. 88f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto - SP.
- Silveira, F.T.; Lainson, R.; Gomes, C.M.C.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* **2008**, *102*: 1075-1080.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentez, L.A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed., *Ed. Universidade/UFRGS* **2003**, 1102 p.

- Sindermann, H.; Croft, S.L.; Engel, K.R.; Bommer, W.; Eibl, H.J.; Unger, C.; Engel, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology* **2004**, *193*(4): 173-180.
- Siqueira, C.A.T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C.L.; Moreno, P.R.H.; Reimão, J.Q.; Tempone, A.G.; Fischer, D.C.H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* Mart., Annonaceae, and in vitro antiprotozoal activity. *Revista brasileira de farmacognosia* **2010**, ISSN 0102-695X.
- 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* **2004**, *40*(2): 139-149.
- Solbach, W.; Laskay T. The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol* **2000**, *74*: 275-317.
- Song, J.Y.; Han, S.K.; Son, E.H.; Pyo, S.N.; Yun, Y.S.; Yi, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Immunopharmacol.* **2002**, *2*: 857-865.
- Souba, W.W. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness. *Curr. Probl. Surg.* **1994**, *31*: 587-643.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fenerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ed. *Nova Odessa: Instituto Plantarum.* **2008**. 704 p.
- Staerk, D.; Lemmich, E.; Christensen, J.; Kharazmi, A.; Olsen, C.E.; Jeroszewski, J. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. *Planta Medica* **2000**, *66*: 531-536.
- Stévigny, C.; Bailly, C.; Quetin-Leclercq, J. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*(2): 173-182.
- Suffredini, I.B.; Sader, H.S.; Gonçalves, A.G.; Reis, A.O.; Gales, A.C.; Varella, A.D.; Younes, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2004**, *37*(3): 379-384.
- Takahashi, M.; Fuchino, H.; Satake, M.; AGATSUMA, Y.; Sekita, S. *In Vitro* Screening of Leishmanicidal Activity in Myanmar Timber Extracts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27*(6): 921-925.
- Tempone, A.G.; Borborema, S.E.T.; Andrade, H.F.; Gualda, N.C.A.; Yogi, A.; Cravalho, C.S.; Bachiega, D.; Lupo, F.N.; Bonotto, S.V.; Fischer, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* **2005**, *12*: 382-390.
- Tewary, P.; Sukumaran, B.; Saxena, S.; Madhubala, R. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. *Vaccine* **2004**, *22*(23-24): 3053-3060.
- 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43*(5): 1234-1241.
- Travi, B.L.; Osorio, Y.; Melby, P.C.; Chandrasekar, B.; Arteaga, L.; Saravia, N.G. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun.* **2002**, *70*: 2288-2296.
- Trotter, R.T.; Logan, M.H.; Rocha, J.M.; Boneta, J.L. Ethnography and bioassay: combined method for a preliminary screen of home remedies for potential pharmacological activity. *J. Ethnopharmacol.* **1982**, *8*: 113-119.

- Valadares, M.C.; Castro, N.C.; Cunha, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células de medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2008**, *43*(4): 631-638.
- Vila Nova, N.S. Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de annonaceae do estado de ceará. **2008**. 70f. Dissertação (Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - CE.
- Von Stebut, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol.* **2007**, *17*: 115-22.
- Waechter, A.I.; Cavé, A.; Hocquemiller, R.; Bories, C.; Muñoz, V.; Fournet, A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research* **1999**, *13*(2): 175-177.
- Waechter, A.I.; Yaluff, G.; Inchausti, A.; Arias, A.R.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Fournet, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research* **1998**, *12*(8): 541-544.
- Weniger, B.; Robledo, S.; Arango, G.; Deharo, E.; Aragon, R.; Muñoz, V.; Callapa, J.; Lobstein, A.; Anton, R. Antiprotozoal activities from Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *78*(2-3): 193-200.
- WHO. World Health Organization **2002**. The leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/print.htm> > Acessado em 22/12/2008.
- WHO. World Health Organization, Control of the Leishmaniasis. Geneva, WHO, (Technical Report Series 703), **1990**, 158 p.
- Wijeratne, E.M.K.; Hatanaka, Y.; Kikuchi, T.; Tezuka, Y.; Gunatilaka, L.A.A. A dioxoaporphine and other alkaloids of two annonaceous plants of Srilanka. *Phytochemistry* **1996**, *42*: 1703-1706.
- Woo, S.H.; Sun, N.J.; Cassady, J.M.; Snapka, R.M. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*: 1141-1145.
- Wu, Y.C.; Lu, S.T.; Chang, J.J.; Lee, K.H. Cytotoxic aporphinoid alkaloids from *thalictrum sessile*. *Phytochemistry* **1988**, *27*(5): 1563-1564.
- Xie, Q.W.; Cho, J.H.; Calaycay, J.; Mumford, R.A.; Swiderek, K.M.; Lee, T.D.; Ding, A.; Troso, T.; Nathan, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **1992**, *256*(5054): 225-228.
- Yang, H.; Li, X.; Tang, Y.; Zhang, N.; Chen, J.; Cai, B. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona genus* plant seeds by HPLC-DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, *49*(1): 140-144.
- Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. *Chapecó: Argos* **2001**, 523p.
- Zafra-Polo, M.C.; Figade, R.E.B.; Gallardo, T.; Tormo, J.R.; Cortes, D. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry* **1998**, *48*(7): 1087-1117.
- Zafra-Polo, M.C.; Gonzáles, M.C.; Estornell, E.; Sahpaz, S.; Cortés, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitor of mitochondrial complex I. *Phytochemistry* **1996**, *42*: 253-271.
- Zambrano-Villa, S.; Rosales-Borjas, D.; Carrero, J.C.; Ortiz-Ortiz, L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* **2002**, *18*: 272-278.
- Zwilling, B.S.; Eisenstein, T.K. Macrophage-pathogen interactions. *New York: Marcel Dekker* **1994**, 634 p.

9. APÊNDICES

9.1 REVISÃO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA FAMÍLIA ANNONACEAE

9.1.1 Extratos e frações da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas promastigotas.

Nome Botânico	Preparação	Parte da planta	Organismo testado	Atividade ^a	Referência
<i>Annona coriácea</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L.chagasi</i>	EC ₅₀ > 100 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ = 41,60 µg/mL	
<i>Annona crassiflora</i>	Extrato etanólico	Casca do caule	<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 12,4 µg/mL	MESQUITA <i>et al.</i> , 2005
		Lenho do caule		IC ₅₀ = 8,3 µg/mL	
	Casca da raiz	IC ₅₀ = 3,7 µg/mL			
		Lenho da raiz		IC ₅₀ = 8,7 µg/mL	
		Folhas	<i>L.chagasi</i>	EC ₅₀ > 100 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica	Folhas	<i>L.chagasi</i>	EC ₅₀ = 24,89 µg/mL	
<i>Annona foetida</i>	Extrato hexano	Casca	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ > 160 µg/mL	COSTA <i>et al.</i> , 2006
				IC ₅₀ = 42,7 µg/mL	
	Extrato diclorometânico		<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 23,0 µg/mL	
				IC ₅₀ = 2,7 µg/mL	
	Extrato etanólico		<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 40,4 µg/mL	
				IC ₅₀ = 23,6 µg/mL	
Fração alcaloídica CH ₂ Cl ₂	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 18,3 µg/mL			
		IC ₅₀ = 10,9 µg/mL			
Fração alcaloídica MeOH	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 24,3 µg/mL			
		IC ₅₀ = 9,1 µg/mL			
<i>Annona glauca</i>	Extrato hexano	Sementes	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ > 100 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
				IC ₁₀₀ > 100 µg/mL	
	IC ₁₀₀ > 100 µg/mL				
	Extrato diclorometânico		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL	
<i>Annona impressivenia</i>	Extrato diclorometânico	Casca	<i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 12,1 µg/mL	SANTOS <i>et al.</i> , 2006
	Fração diclorometano			IC ₅₀ = 12,9 µg/mL	
<i>Annona muricata</i>	Extrato hexano	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 100 µg/MI IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 98,6 µg/mL IC ₅₀ = 76,3 µg/mL IC ₅₀ = 83,1 µg/mL	
		Pericarpo	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	MEC > 1,0 µg/mL MEC = 1,0 µg/mL	
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 25 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
				IC ₅₀ = 25 µg/mL IC ₅₀ = 25 µg/mL	

		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 63,2 µg/mL IC ₅₀ = 63,2 µg/mL IC ₅₀ = 63,2 µg/mL	
		Pericarpo	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	MEC = 0,1 µg/mL MEC = 0,1 µg/mL	
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 98,6 µg/mL IC ₅₀ = 98,6 µg/mL IC ₅₀ = 98,6 µg/mL	
		Pericarpo	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	MEC > 1,0 µg/mL MEC = 1,0 µg/mL	JARAMILO <i>et al.</i> , 2000
		Sementes	<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ = 54,93 µg/mL	VILA NOVA <i>et al.</i> , 2008
<i>Ammona purpúrea</i>	Extrato etanólico	Casca	<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 113,24 µg/mL	CAMACHO <i>et al.</i> , 2003
		Sementes		IC ₅₀ = 28,57 µg/mL	
	Extrato aquoso	Casca		IC ₅₀ = 289 µg/mL	
		Sementes		IC ₅₀ = 179,90 µg/mL	
<i>Ammona squamosa</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ = 26,43 µg/mL	VILA NOVA <i>et al.</i> , 2008
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ = 73,31 µg/mL	
<i>Cananga odorata</i>	Extrato etanólico	Ne	<i>L. major</i>	MLC = 200 µg/mL MIC = 100 µg/mL	TAKAHASHI, 2004
<i>Cardiopetalum calophyllum</i>	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	FOURNET <i>et al.</i> , 1994
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
	Fração alcaloídica	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	

			<i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL	
	Extrato éter de petróleo	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
<i>Desmopsis panamensis</i>	Extrato hexano	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 58,3 µg/mL IC ₅₀ = 58,3 µg/mL IC ₅₀ = 58,3 µg/mL	
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 76,3 µg/mL IC ₅₀ = 79,4 µg/mL IC ₅₀ = 83,3 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
<i>Duguetia furfuracea</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ > 100 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ > 100 µg/mL	
<i>Duguetia lanceolata</i>	Extrato etanólico			EC ₅₀ > 100 µg/mL	
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ > 100 µg/mL	
<i>Duguetia spixiana</i>	Fração alcaloídica	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	FOURNET <i>et al.</i> , 1994
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	
	Extrato clorofórmio	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	

			<i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL	
	Extrato etanólico	Frutos	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	
	Extrato éter de petróleo	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
<i>Guatteria australis</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ > 100 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ = 37,88 µg/mL	
<i>Guatteria foliosa</i>	Fração alcaloídica	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	MAHIOU <i>et al.</i> , 1994
		Raízes	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	
<i>Guatteria schomburgkiana</i>	Fração alcaloídica	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	FOURNET <i>et al.</i> , 1994
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	
	Extrato acetato de etila	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
	Extrato etanólico	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
	Extrato éter de petróleo	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca da raiz	<i>L. amazonensis</i>	Inactive at 100 µg/mL	

			<i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
<i>Pseudomalmea boyacana</i>	Extrato hexano	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 95,8 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 58,3 µg/mL IC ₅₀ = 53,7 µg/mL IC ₅₀ = 65,4 µg/mL	
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 48,9 µg/mL IC ₅₀ = 48,6 µg/mL IC ₅₀ = 66,0 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 70,9 µg/mL IC ₅₀ = 73,5 µg/mL IC ₅₀ = 85,1 µg/mL	
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
<i>Annona emarginata</i> (sinonímia <i>Rollinia emarginata</i>)	Extrato hexano	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL	FÉVRIER <i>et al.</i> , 1999
	Extrato diclorometânico		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	
	Extrato etanólico		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL	
<i>Annona exsucca</i> (sinonímia <i>Rollinia exsucca</i>)	Extrato hexano	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 83,1 µg/mL IC ₅₀ = 79,6 µg/mL IC ₅₀ = 79,6 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 20,8 µg/mL	
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 100 µg/mL IC ₅₀ = 100 µg/mL IC ₅₀ = 100 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ = 54,4 µg/mL IC ₅₀ = 54,4 µg/mL	

			<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 62,4 µg/mL		
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL		
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL		
<i>Annona papilionella</i> (sinonímia <i>Rollinia pittieri</i>)	Extrato hexano	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 12,6 µg/mL IC ₅₀ = 10,7 µg/mL IC ₅₀ = 10,7 µg/mL		
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 13,3 µg/mL IC ₅₀ = 15,1 µg/mL IC ₅₀ = 15,1 µg/mL		
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 20,8 µg/mL		
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 25,0 µg/mL IC ₅₀ = 19,7 µg/mL		
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 19,7 µg/mL IC ₅₀ = 31,4 µg/mL IC ₅₀ = 43,8 µg/mL		
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL		
	<i>Unonopsis buchtienii</i>	Extrato éter de petróleo	Casca do caule	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 50 µg/mL IC ₁₀₀ = 50 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
		Extrato diclorometânico		<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	
<i>Unonopsis spectabilis</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 64,3 µg/mL IC ₅₀ = 25,5 µg/mL	SATALAYA <i>et al.</i> , 2009	
	Extrato diclorometânico		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 65,3 µg/mL IC ₅₀ = 54,2 µg/mL IC ₅₀ = 24,5 µg/mL		
<i>Xylopiá aromática</i>	Fração alcaloídica	Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	FOURNET <i>et al.</i> , 1994	
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL		

		Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
	Extrato éter de petróleo	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL Inactive at 100 µg/mL	
		Casca do caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL IC ₉₀ = 100 µg/mL	
	Extrato hexano	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ = 100 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
		Casca	<i>L. amazonensis</i> <i>L. chagasi</i>	IC ₅₀ = 15,77 µg/mL IC ₅₀ = 29,10 µg/mL	NUNES, 2008
	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 72,2 µg/mL IC ₅₀ = 74,0 µg/mL IC ₅₀ = 74,0 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 70,8 µg/mL IC ₅₀ = 78,8 µg/mL IC ₅₀ = 100 µg/mL	
	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 20,8 µg/mL IC ₅₀ = 20,8 µg/mL	
		Caule	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL IC ₅₀ > 100 µg/mL	
<i>Xylopi</i> a <i>emarginata</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ > 100 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ > 100 µg/mL	
<i>Xylopi</i> a <i>parviflora</i>	Extrato etanólico	Folhas	<i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 101 µg/mL IC ₅₀ = 31,2 µg/mL	SATAYAYA <i>et al.</i> , 2009
	Extrato diclorometânico		<i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ = 61,7 µg/mL	

	Extrato etanólico fração diclorometano		<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 103,4 µg/mL	
			<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 101 µg/mL	
Pentamidina ^b			<i>L. amazonensis</i>	IC ₉₀ = 2,5 µg/mL	FOURNET <i>et al.</i> , 1994
			<i>L. braziliensis</i>	IC ₉₀ = 2,5 µg/mL	
			<i>L. donovani</i>	IC ₉₀ = 2,5 µg/mL	
			<i>L. amazonensis</i>	IC ₁₀₀ = 5,0 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
			<i>L. braziliensis</i>	IC ₁₀₀ = 5,0 µg/mL	
			<i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5,0 µg/mL	
			<i>L. braziliensis</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	FÉVRIER <i>et al.</i> , 1999
			<i>L. amazonensis</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	
			<i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	
			<i>L. major</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
			<i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	
			<i>L. donovani</i> DD8 WT	IC ₅₀ = 7,34 µM	AKENDENGUE <i>et al.</i> , 2002
			<i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 8,52 µM	
			<i>L. donovani</i> DD8 WT	IC ₅₀ = 7,3 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
			<i>L. donovani</i> DD8 Penta-R	IC ₅₀ = 53,6 µM	
			<i>L. donovani</i> DD8 Paro-R	IC ₅₀ = 9,8 µM	
			<i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 8,5 µM	
<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ = 1,69 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005			
<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 3,1 µg/mL	MESQUITA <i>et al.</i> , 2005			
<i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ = 2,9 µM	COSTA <i>et al.</i> , 2006			
<i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 0,9 µM				
<i>L. amazonensis</i>	IC ₅₀ = 10,0 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007			
<i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ = 10,0 µg/mL				
<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 10,0 µg/mL				
<i>L. chagasi</i>	EC ₅₀ = 1,63 µg/mL	VILA NOVA <i>et al.</i> , 2008			
<i>L. amazonensis</i>	IC ₅₀ = 4,8 µg/mL	COSTA <i>et al.</i> , 2009			
<i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ = 1,0 µg/mL				
<i>L. chagasi</i>	IC ₅₀ = 19,0 µg/mL				
<i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 0,3 µg/mL				
<i>L. amazonensis</i>	IC ₅₀ = 0,16 µg/mL	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2010			
<i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ = 0,06 µg/mL				
<i>L. chagasi</i>	IC ₅₀ = 0,22 µg/mL				
<i>L. major</i>	IC ₅₀ = 0,16 µg/mL				

^a EC₅₀, 50% de Concentração Efetiva; IC₅₀, 50% de Concentração Inibitória; IC₉₀, 90% de Concentração Inibitória; IC₁₀₀, 100% de Concentração Inibitória; MEC, Concentração Efetiva Mínima; MLC, Concentração Letal Mínima; MIC, Concentração Inibitória mínima. Ne, Não especificado.

^b Droga referência.

9.1.2 Moléculas definidas da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas promastigotas.

Substância química	Classe	Organismo testado	Atividade ^a	Referência
Annomontine	Alcalóide	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 34,8 µM IC ₅₀ > 613,0 µM	COSTA <i>et al.</i> , 2006
Annomontine, <i>N</i> -hydroxy	Alcalóide	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 252,7 µM IC ₅₀ = 437,5 µM	
Anonaine	Alcalóide	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25 µg/mL IC ₁₀₀ = 50 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	QUEIROZ <i>et al.</i> , 1996
Annonacin A	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 10,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 10,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 10,0 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
Annonacin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL	
		<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Para-R <i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 23,3 µM IC ₅₀ = 92,1 µM IC ₅₀ = 97,5 µM IC ₅₀ > 100 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Annonacin, iso	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Para-R <i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 5,1 µM IC ₅₀ = 5,2 µM IC ₅₀ = 9,8 µM IC ₅₀ = 9,4 µM	
Annonacin, 2,33 dihydro	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Para-R <i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 4,9 µM IC ₅₀ = 3,5 µM IC ₅₀ = 2,8 µM IC ₅₀ = 11,9 µM	
Boldine, iso	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ > 916,0 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Cherimolin-1	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Para-R <i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 9,8 µM IC ₅₀ = 48,8 µM IC ₅₀ > 100 µM IC ₅₀ = 29,6 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Cryptodrine	Alcalóide	<i>L. mexicana</i> <i>L. panamensis</i>	IC ₅₀ = 3 µM IC ₅₀ = 6 µM	MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2003
Domesticine, iso	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 73,3 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Domesticine, noriso	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 48,2 µM	
Espintanol	Monoterpeno	<i>L. amazonensis</i> <i>L. aristidesi</i> <i>L. braziliensis</i>	IC ₉₀ = 25 µg/mL IC ₉₀ = 25 µg/mL IC ₉₀ = 10 µg/mL	HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 1991

		<i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i>	IC ₉₀ = 25 µg/mL IC ₉₀ = 50 µg/mL IC ₉₀ = 25 µg/mL IC ₉₀ = 50 µg/mL IC ₉₀ = 25 µg/mL	
Glaucafilin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
Glaucanisin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL	
Goniothalamycin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 5,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 5,0 µg/mL	
Guattouregidine, iso	Alcalóide	<i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	MAHIOU <i>et al.</i> , 1994
Klaivanolide	Alcalóide	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 AmB-R	IC ₅₀ = 1,75 µM IC ₅₀ = 3,12 µM	AKENDENGUE <i>et al.</i> , 2002
Laurotetanina, N-methyl	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 395,0 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Liriodenine	Alcalóide	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	QUEIROZ <i>et al.</i> , 1996
		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	FÉVRIER <i>et al.</i> , 1999
		<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 3,12 µg/mL IC ₁₀₀ = 3,12 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
		<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 58,5 µM IC ₅₀ = 21,5 µM	COSTA <i>et al.</i> , 2006
Lirioferine	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 210,0 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Lirioferine, nor	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ > 916,0 µM	
Lysicamine	Alcalóide	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25 µg/mL IC ₁₀₀ = 25 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
Molvizarin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998

Moschatoline, <i>O</i> -methyl	Alcalóide	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	IC ₅₀ = 320,8 µM IC ₅₀ = 103,7 µM	COSTA <i>et al.</i> , 2006
		<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 50 µg/mL IC ₁₀₀ = 50 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
Nantenine	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 41,0 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Nantenine, nor	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₁₀₀ = 15 µM	MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2003
Narumicin-1	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 7,3 µM IC ₅₀ = 5,1 µM IC ₅₀ = 11,9 µM IC ₅₀ = 2,9 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Narumicin-2		<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 10,9 µM IC ₅₀ = 5,2 µM IC ₅₀ = 98,6 µM IC ₅₀ = 11,8 µM	
Neolitsine	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 15,4 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Obaberine	Alcalóide	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ ~ 50 µg/mL	FOURNET <i>et al.</i> , 1988
Panalicin	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 12,1 µM IC ₅₀ > 100 µM IC ₅₀ = 74,7 µM IC ₅₀ = 2,2 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Parviflorin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL IC ₁₀₀ > 100 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
Puertogaline A	Alcalóide	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	MAHIOU <i>et al.</i> , 2000
Puertogaline B		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL IC ₁₀₀ = 100 µg/mL	
Reticuline	Alcalóide	<i>L. maxicana</i>	IC ₅₀ = 518,0 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Rollidecin B	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 50 µg/mL IC ₁₀₀ = 50 µg/mL IC ₁₀₀ = 50 µg/mL	FÉVRIER <i>et al.</i> , 1999
Rolliniastatin-1		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	
		<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R	IC ₅₀ = 4,7 µM IC ₅₀ > 100 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004

		<i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ > 100 µM IC ₅₀ > 100 µM	
Rolliniastatin-1, iso	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 11,2 µM IC ₅₀ = 38,5 µM IC ₅₀ = 85,3 µM IC ₅₀ = 90,3 µM	
Rolliniastatin-1, 2,35 Dihydro	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 47,3 µM IC ₅₀ = 12,5 µM IC ₅₀ = 11,9 µM IC ₅₀ > 100 µM	
Rolliniastatin – 2	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
		<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 10,1 µM IC ₅₀ > 100 µM IC ₅₀ = 97,4 µM IC ₅₀ > 100 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Squamocin	Acetogenina	<i>L. donovani</i> DD8 WT <i>L. donovani</i> DD8 Penta-R <i>L. donovani</i> DD8 Paro-R <i>L. donovani</i> DD8 AmbB-R	IC ₅₀ = 9,4 µM IC ₅₀ > 100 µM IC ₅₀ > 100 µM IC ₅₀ > 100 µM	
		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL IC ₁₀₀ = 25,0 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
		<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 5 µg/mL	FÉVRIER <i>et al.</i> , 1999
Sylvaticin	Acetogenina	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 10 µg/mL IC ₁₀₀ = 10 µg/mL IC ₁₀₀ = 10 µg/mL	FÉVRIER <i>et al.</i> , 1999
Unonopsine	Alcalóide	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	IC ₁₀₀ = 25 µg/mL IC ₁₀₀ = 25 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
Xylopine	Alcalóide	<i>L. mexicana</i> <i>L. panamensis</i>	IC ₅₀ = 3 µM IC ₅₀ = 6 µM	MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2003

^a IC₅₀, 50% de Concentração Inibitória; IC₉₀, 90% de Concentração Inibitória; IC₁₀₀, 100% de Concentração Inibitória.

9.1.3 Extratos e frações da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas intracelulares.

Nome Botânico	Preparação	Parte da planta	Organismo testado	Atividade	Referência
<i>Amnona coriacea</i>	Fração alcaloídica	Folhas	<i>L.chagasi</i>	25 µg/mL = 27.20%	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
<i>Amnona crassiflora</i>	Fração alcaloídica	Folhas	<i>L.chagasi</i>	25 µg/mL = 86.1%	
<i>Amnona muricata</i>	Extrato etanólico	Sementes	<i>L.chagasi</i>	100 µg/mL = 11.11%	VILA NOVA <i>et al.</i> , 2008
<i>Duguetia lanceolata</i>	Fração alcaloídica	Folhas	<i>L.chagasi</i>	0%	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
<i>Xyloplia aromatica</i>	Extrato hexano	Casca	<i>L. amazonensis</i>	40 µg/mL = 56.69% 8 µg/mL = 51.03% 1,6 µg/mL = 41.86%	NUNES, 2008
Pentamidina ^a			<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 2,5 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004

^a Droga referência.

9.1.4 Moléculas definidas da família Annonaceae com atividade leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas intracelulares.

Substância química	Classe	Organismo testado	Atividade ^a	Referência
Annonacin, iso	Acetogenina	<i>L. donovani</i>	IC ₅₀ = 6.2 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Cherimolin-1			IC ₅₀ = 13.5 µM	
Rolliniastatin-1			IC ₅₀ = 2.5 µM	
Rolliniastatin-1, iso			IC ₅₀ = 7.5 µM	
Rolliniastatin-1, 2,35 Dihydro			IC ₅₀ = 7.5 µM	
Rolliniastatin-2			IC ₅₀ = 29.7 µM	
Squamocin			IC ₅₀ = 23.2 µM	

^a IC₅₀, 50% de Concentração Inibitória.

9.1.5 Citotoxicidade de extratos e frações da família Annonaceae em células.

Nome Botânico	Preparação	Parte da planta	Organismo testado	Citotoxicidade ^a	Referência
<i>Annona cherimolia</i>	Extrato etanólico	Folhas	Células epiteliais de rim de bovinos	CC ₅₀ = 41,7 x 10 ⁻³ µg/mL	BETANCUR-GALVIS <i>et al.</i> , 1999
<i>Annona coriacea</i>	Extrato etanólico	Folhas	Macrófagos de murinos - células RAW 264,7	EC ₅₀ = 57,09 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ = 22,88 µg/mL	
<i>Annona crassiflora</i>	Extrato etanólico	Folhas		EC ₅₀ = 98,48 µg/mL	
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ = 23,79 µg/mL	
<i>Annona glauca</i>	Extrato hexano	Sementes	Células epiteliais de rim de macaco Carcinoma da nasofaringe de homem	IC ₁₀₀ = 5 µg/mL IC ₁₀₀ = 1,5 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1998
	Extrato diclorometano			IC ₁₀₀ = 5x10 ⁻⁵ µg/mL IC ₁₀₀ = 5x10 ⁻⁵ µg/mL	
<i>Annona muricata</i>	Extrato hexano	Pericarpo	Linhagem celular U-937	MEC = 1,0 µg/mL	JARAMILO <i>et al.</i> , 2000
	Extrato acetato de etila	Folhas	Linhagem celular U-937	MEC = 0,1 µg/mL LC ₅₀ = 7,8 µg/mL	
	Extrato etanólico	Pericarpo	Linhagem celular U-937	MEC > 1,0 µg/mL	JARAMILO <i>et al.</i> , 2000
	Extrato etanólico	Folhas	Células epiteliais de rim de bovinos	CC ₅₀ = 20 x 10 ⁻⁴ µg/mL	BETANCUR-GALVIS <i>et al.</i> , 1999
	Sementes		CC ₅₀ = 24 x 10 ⁻⁵ µg/mL		
<i>Annona purpurea</i>	Extrato etanólico	Casca	Carcinoma da nasofaringe de homem	IC ₅₀ = 0,0098 µg/mL	CAMACHO <i>et al.</i> , 2003
		Sementes		IC ₅₀ = 0,0001 µg/mL	
	Extrato aquoso	Casca		IC ₅₀ = 79,40 µg/mL	
		Sementes		IC ₅₀ = 59,40 µg/mL	
<i>Annona sp.</i>	Extrato etanólico	Sementes	Células epiteliais de rim de bovinos Células epiteliais do carcinoma de laringe do homem (HEP-2 / 24 hr) Células epiteliais do carcinoma de laringe do homem (HEP-2 / 72 hr)	CC ₅₀ = 34,5 x 10 ⁻³ µg/mL CC ₅₀ = 55 µg/mL CC ₅₀ = 4,96 x 10 ⁻² µg/mL	BETANCUR-GALVIS <i>et al.</i> , 1999
<i>Desmopsis panamensis</i>	Extrato hexano	Folhas	Linhagem celular U-937	LC ₅₀ = 111,0 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
	Extrato acetato de etila			LC ₅₀ = 38,5 µg/mL	
<i>Duguetia furfuracea</i>	Extrato etanólico	Folhas	Macrófagos de murinos - células RAW 264,7	EC ₅₀ > 120,0 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ > 58,01 µg/mL	
<i>Duguetia lanceolata</i>	Extrato etanólico	Folhas	Macrófagos de murinos - células RAW 264,7	EC ₅₀ > 120,0 µg/mL	
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ > 120,0 µg/mL	
<i>Guatteria australis</i>	Extrato etanólico			EC ₅₀ > 120,0 µg/mL	
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ > 29,86 µg/mL	
<i>Pseudomalmea</i>	Extrato acetato de	Caule	Linhagem celular U-937	LC ₅₀ = 196,0 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007

<i>boyacana</i>	etila				
<i>Annona exsucca</i> (sinonímia <i>Rollinia exsucca</i>)	Extrato hexano	Caule	Linhagem celular U-937	LC ₅₀ = 39,0 µg/mL	
<i>Annona rensoniana</i> (sinonímia <i>Rollinia membranacea</i>)	Extrato hexano	Raízes	Células epiteliais de rim de bovinos Células epiteliais do carcinoma de laringe do homem (HEP-2 / 24 hr) Células epiteliais do carcinoma de laringe do homem (HEP-2 / 72 hr)	CC ₅₀ = 45 x 10 ⁻² µg/mL CC ₅₀ = 4,12 µg/mL CC ₅₀ = Nd	BETANCUR-GALVIS <i>et al.</i> , 1999
<i>Annona papilionella</i> (sinonímia <i>Rollinia pittieri</i>)	Extrato hexano	Folhas	Linhagem celular U-937	LC ₅₀ = 170,5 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
	Extrato acetato de etila			LC ₅₀ = 56,5 µg/mL	
	Extrato etanólico			LC ₅₀ = 81,5 µg/mL	
	Extrato hexano	LC ₅₀ = 14,5 µg/mL			
	Extrato acetato de etila	Caule		LC ₅₀ = 115,5 µg/mL	
<i>Unonopsis buchtienii</i>	Extrato éter de petróleo	Casca do caule	Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 28 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
	Extrato diclorometano			IC ₅₀ = 35 µg/mL	
	Extrato etanólico			IC ₅₀ = 126 µg/mL	
<i>Xylopia aromatica</i>	Extrato etanólico	Folhas	Linhagem celular U-937	LC ₅₀ = 100,0 µg/mL	OSORIO <i>et al.</i> , 2007
	Extrato hexano	Casca	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744	CC ₅₀ = 108,31 µg/mL	NUNES, 2008
<i>X. emarginata</i>	Extrato etanólico	Folhas	Macrófagos de murinos - células RAW 264,7	EC ₅₀ = 71,91 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
	Fração alcaloídica			EC ₅₀ = 89,65 µg/mL	
Pentamidina ^b			Macrófagos peritoneais de ratos	IC ₅₀ = 53,2 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
			Macrófagos de murinos - células RAW 264,7	EC ₅₀ = 18,83 µg/mL	TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
			Macrófagos peritoneais de hámster Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	IC ₅₀ = 0,00 µg/mL IC ₅₀ = 5,47 µg/mL	COSTA <i>et al.</i> , 2009

^a CC₅₀, 50% de Concentração Citotóxica; EC₅₀, 50% de Concentração Efetiva; IC₅₀, 50% de Concentração Inibitória; IC₉₀, 90% de Concentração Inibitória; IC₁₀₀, 100% de Concentração Inibitória; MEC, Concentração Efetiva Mínima; LC₅₀, 50% de concentração letal.

^b Droga referência.

9.1.6 Citotoxicidade de moléculas definidas da família Annonaceae em células.

Substância química	Classe	Organismo testado	Atividade ^a	Referência
Annonacin	Acetogenina	Macrófagos peritoneais de ratos	IC ₅₀ = 53.2 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Annonacin, iso			IC ₅₀ = 12.7 µM	
Annonacin, 2,33 dihydro			IC ₅₀ = 11.8 µM	
Boldine, iso	Alcalóide	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744 Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ > 610 µM IC ₅₀ = 538 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Cherimolin-1	Acetogenina	Macrófagos peritoneais de ratos	IC ₅₀ = 21.2 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Domesticine, iso	Alcalóide	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744 Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 415 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Domesticine, noriso			IC ₅₀ > 611 µM	
			IC ₅₀ > 642 µM IC ₅₀ > 642 µM	
Laurotetanina, N-methyl			IC ₅₀ = 331 µM IC ₅₀ > 586 µM	
Liriodenine	Alcalóide	Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 1 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
Lirioferine	Alcalóide	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744 Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 401 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Lirioferine, nor			IC ₅₀ > 586 µM	
			IC ₅₀ = 406 µM IC ₅₀ = 428 µM	
Lysicamine	Alcalóide	Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 8 µg/mL	WAECHTER <i>et al.</i> , 1999
Moschatoline, O-methyl			IC ₅₀ = 7 µg/mL	
Nantenine	Alcalóide	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744 Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 315 µM IC ₅₀ > 345 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Narumicin-1	Acetogenina	Macrófagos peritoneais de ratos	IC ₅₀ = 12.8 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Narumicin-2			IC ₅₀ = 12.5 µM	
Neolitsine	Alcalóide	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744 Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ = 387 µM IC ₅₀ > 619 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Panalicin	Acetogenina	Macrófagos peritoneais de ratos	IC ₅₀ = 12.4 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Reticuline	Alcalóide	Macrófagos de murinos - linhagem celular J744 Células epiteliais de rim de macaco	IC ₅₀ > 668 µM IC ₅₀ > 668 µM	CORREA <i>et al.</i> , 2006
Rolliniastatin-1	Acetogenina	Macrófagos peritoneais de ratos	IC ₅₀ = 45.2 µM	GRANDIC <i>et al.</i> , 2004
Rolliniastatin-1, iso			IC ₅₀ = 56.2 µM	
Rolliniastatin-1, 2,35 Dihydro			IC ₅₀ = 18.4 µM	
Rolliniastatin – 2			IC ₅₀ = 53.1 µM	
Squamocin			IC ₅₀ = 46.7 µM	

^a IC₅₀, 50% de Concentração Inibitória.

9.2 ATIVIDADE EM FORMAS PROMASTIGOTAS

9.2.1 Taxa de inibição de crescimento de formas promastigotas de *leishmania in vitro*.

Código	Concentrações (µg/mL)	Número de promastigotas x 10 ⁵ ± SD ^a			Inibição de crescimento %		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
LIRIO	100	0,96 ± 2,25	765,30 ± 765,30	14,94 ± 25,68	99,18	73,67	89,85
	50	2,05 ± 2,34	1283,00 ± 698,10	18,93 ± 30,03	98,24	55,86	87,14
	25	3,44 ± 2,87	1860,00 ± 1082,00	26,47 ± 28,90	97,06	36,01	82,02
	12	10,99 ± 7,28	2404,00 ± 1254,00	30,29 ± 31,15	90,06	17,30	79,43
	6	22,46 ± 17,74	2945,00 ± 1001,00	35,30 ± 32,40	80,81	1,30	76,03
	Controle	117,1 ± 73,35	2907,00 ± 1186,00	147,30 ± 60,58	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	123,6 ± 78,36	2849,00 ± 1209,00	150,20 ± 58,56	0,00	1,99	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	22,50 ± 24,78	0,00 ± 0,00	100,00	99,22	100,00
EDF	100	0,00 ± 0,00	136,70 ± 127,70	0,00 ± 0,00	100,00	70,25	100,00
	50	0,06 ± 0,13	245,20 ± 255,10	6,28 ± 7,82	99,95	46,63	94,10
	25	9,87 ± 12,16	296,80 ± 295,70	19,13 ± 19,44	91,90	35,40	82,05
	12	60,83 ± 45,04	346,00 ± 357,20	41,83 ± 33,64	50,09	24,70	60,75
	6	90,25 ± 50,85	369,80 ± 388,30	63,40 ± 51,84	25,96	19,52	40,52
	Controle	121,90 ± 26,91	459,50 ± 521,20	106,60 ± 71,37	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	95,50 ± 43,65	453,20 ± 516,30	122,70 ± 99,65	21,65	1,37	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	8,50 ± 7,50	0,00 ± 0,00	100,00	98,15	100,00
EHF	100	0,00 ± 0,00	208,20 ± 191,00	79,66 ± 11,42	100,00	54,68	30,54
	50	8,70 ± 14,02	259,30 ± 261,80	89,33 ± 12,09	86,49	43,56	22,14
	25	21,67 ± 36,79	405,50 ± 466,00	102,70 ± 12,01	66,36	11,75	10,46
	12	49,78 ± 44,03	424,50 ± 490,50	103,80 ± 31,52	22,73	7,61	9,50
	6	63,40 ± 57,29	433,30 ± 494,60	128,10 ± 24,34	1,59	5,70	0,00
	Controle	64,63 ± 56,14	459,50 ± 521,20	114,70 ± 22,73	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	61,48 ± 52,77	453,20 ± 516,30	117,90 ± 20,72	4,57	1,37	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	8,50 ± 7,50	0,00 ± 0,00	100,00	98,15	100,00
EMF	100	0,00 ± 0,00	175,00 ± 159,80	79,82 ± 40,11	100,00	61,91	25,12
	50	37,17 ± 24,07	240,70 ± 231,70	89,50 ± 47,34	69,50	47,61	16,04
	25	76,92 ± 35,83	265,20 ± 238,80	95,00 ± 45,68	36,89	42,28	10,88
	12	91,25 ± 33,73	269,50 ± 242,80	106,80 ± 57,17	25,14	41,34	0,00
	6	97,83 ± 31,81	281,50 ± 255,00	116,40 ± 62,23	19,74	38,73	0,00
	Controle	121,90 ± 26,91	459,50 ± 521,20	106,60 ± 71,37	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	95,50 ± 43,65	453,20 ± 516,30	122,70 ± 99,65	21,65	1,37	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	8,50 ± 7,50	0,00 ± 0,00	100,00	98,15	100,00
EHS	100	22,83 ± 19,95	75,75 ± 17,17	71,98 ± 25,61	73,24	35,42	48,51
	50	32,63 ± 21,66	84,75 ± 17,11	88,61 ± 43,47	61,76	27,74	36,61

	25	41,27 ± 29,02	98,50 ± 19,22	100,50 ± 54,82	51,63	16,02	28,11
	12	60,05 ± 37,08	102,50 ± 19,22	116,20 ± 71,88	29,62	12,61	16,88
	6	62,68 ± 36,94	105,30 ± 19,44	125,80 ± 80,59	26,54	10,23	10,01
	Controle	85,33 ± 37,33	117,30 ± 30,91	139,80 ± 41,01	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	81,29 ± 36,45	119,80 ± 39,02	142,60 ± 39,89	4,73	0,00	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	2,50 ± 3,00	0,00 ± 0,00	100,0	97,86	100,0
EMS	100	19,17 ± 17,82	90,75 ± 44,28	110,90 ± 83,06	77,53	22,63	22,17
	50	29,72 ± 18,70	104,50 ± 41,06	121,30 ± 82,43	65,17	10,91	14,87
	25	35,10 ± 26,78	113,30 ± 48,30	138,40 ± 73,46	58,86	3,41	2,87
	12	48,55 ± 31,79	118,30 ± 48,25	150,90 ± 76,05	43,10	0,00	0,00
	6	54,18 ± 33,36	133,00 ± 61,24	158,50 ± 77,01	36,50	0,00	0,00
	Controle	85,33 ± 37,36	117,30 ± 30,91	142,50 ± 22,19	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	81,29 ± 36,45	119,80 ± 39,02	143,80 ± 21,13	4,73	0,00	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	2,50 ± 3,00	0,00 ± 0,00	100,00	97,86	100,00
FAEARM	100	27,38 ± 29,61	993,00 ± 1119,00	50,08 ± 28,57	77,75	65,84	59,21
	50	41,24 ± 35,41	1398,00 ± 1532,00	57,32 ± 32,38	66,49	51,90	53,32
	25	58,16 ± 29,44	1490,00 ± 1583,00	65,46 ± 33,33	52,75	48,74	46,69
	12	69,06 ± 27,72	2606,00 ± 1448,00	81,03 ± 26,28	43,89	10,35	34,01
	6	76,52 ± 28,76	2779,00 ± 1238,00	90,04 ± 28,30	37,83	4,40	26,67
	Controle	123,10 ± 29,78	2907,00 ± 1186,00	122,80 ± 33,70	0,00	0,00	0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	128,70 ± 29,49	2849,00 ± 1209,00	126,80 ± 32,81	0,00	1,99	0,00
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	22,50 ± 24,78	0,00 ± 0,00	100,00	99,22	100,00
FALASF	100	0,00 ± 0,00	ND	ND	100,00	ND	ND
	50	14,20 ± 1,41			90,89		
	25	39,90 ± 2,12			74,42		
	12	58,50 ± 2,12			62,50		
	6	74,50 ± 0,70			52,24		
	Controle	156,00 ± 2,80			0,00		
	DMSO 0,7% - 50 ^b	150,00 ± 0,00			3,84		
	Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00			100,00		
FALASGF	100	0,00 ± 0,00	ND	ND	100,00	ND	ND
	50	0,00 ± 0,00			100,00		
	25	1,50 ± 0,40			99,03		
	12	45,00 ± 1,41			71,15		
	6	51,25 ± 1,76			67,14		
	Controle	156,00 ± 2,80			0,00		
	DMSO 0,7% - 50 ^b	150,00 ± 0,00			3,84		

	Pentamidina – 50 ^c	0,00 ± 0,00			100,00			
EHGFAS	100	0,00 ± 0,00	2061,00 ± 1664,00	ND	100,00	29,10	ND	
	50	0,00 ± 0,00	2416,00 ± 1593,00		100,00	16,89		
	25	0,00 ± 0,00	2692,00 ± 1364,00		100,00	7,39		
	12	2,60 ± 0,28	2834,00 ± 1207,00		97,15	2,51		
	6	2,70 ± 0,14	2889,00 ± 1176,00		97,04	0,61		
	Controle	91,50 ± 2,12	2907,00 ± 1186,00		0,00	0,00		
	DMSO 0,7% - 50 ^b	89,50 ± 0,70	2849,00 ± 1209,00		2,18	1,99		
	Pentamidina – 50 ^c	0,00 ± 0,00	22,50 ± 24,78		100,00	99,22		
EMGFAS	100	11,50 ± 2,12	1817,00 ± 2070,00	ND	91,15	37,49	ND	
	50	14,00 ± 5,65	1706,00 ± 1904,00		89,23	41,31		
	25	107,50 ± 3,53	1962,00 ± 2175,00		17,30	32,50		
	12	100,00 ± 2,82	2198,00 ± 1931,00		23,07	24,38		
	6	106,00 ± 1,41	2479,00 ± 1637,00		18,46	14,72		
	Controle	130,00 ± 2,82	2907,00 ± 1186,00		0,00	0,00		
	DMSO 0,7% - 50 ^b	125,50 ± 0,70	2849,00 ± 1209,00		3,46	1,99		
	Pentamidina – 50 ^c	0,00 ± 0,00	22,50 ± 24,78		100,00	99,22		
FALEAF	100	0,00 ± 0,00	ND	ND	100,00	ND	ND	
	50	0,00 ± 0,00			100,00			
	25	32,80 ± 1,13			78,97			
	12	38,50 ± 0,70			75,32			
	6	44,40 ± 0,84			71,53			
	Controle	156,00 ± 2,82			0,00			
	DMSO 0,7% - 50 ^b	150,00 ± 0,00			3,84			
	Pentamidina – 50 ^c	0,00 ± 0,00			100,00			
FALEAGF	100	0,00 ± 0,00	ND	ND	100,00	23,46	ND	
	50	33,00 ± 0,84			2263,00 ± 1846,00	78,84		22,15
	25	40,80 ± 1,13			2412,00 ± 1697,00	73,84		17,02
	12	55,00 ± 0,00			2485,00 ± 1621,00	64,74		14,51
	6	59,00 ± 1,41			2505,00 ± 1615,00	62,17		13,82
	Controle	156,00 ± 2,82			2907,00 ± 1186,00	0,00		0,00
	DMSO 0,7% - 50 ^b	150,00 ± 0,00			2849,00 ± 1209,00	3,84		1,99
	Pentamidina – 50 ^c	0,00 ± 0,00			22,50 ± 24,78	100,00		99,22

^a Os resultados representam a média de seis experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95% ± SD, Desvio padrão.

^b Promotor de solubilidade.

^c Droga referência.

9.3 ATIVIDADE EM FORMAS AMASTIGOTAS

9.3.1 Teste de infecção em macrófagos *in vitro*.

DROGA	PLACA	24 h			48 h			96 h		
		Infectados	Não infectados	Leishmania	Infectados	Não infectados	Leishmania	Infectados	Não infectados	Leishmania
Controle	N1	76	124	330	71	129	540	89	111	684
		74	126	325	77	123	673	83	117	593
	N2	91	109	542	79	121	659	90	110	673
		80	120	408	83	117	697	87	113	613
	N3	89	111	400	79	121	670	85	115	697
		78	122	382	85	115	692	89	111	602
DMSO	N1	88	112	396	79	121	580	83	117	612
		92	108	403	73	127	597	89	111	595
	N2	68	132	310	81	119	510	87	113	602
		95	105	415	80	120	602	81	119	583
	N3	92	108	420	75	125	618	89	111	610
		80	120	398	72	128	593	78	122	513
Pentamidina	N1	17	183	56	0	0	0	0	0	0
		15	185	51	0	0	0	0	0	0
	N2	10	190	37	0	0	0	0	0	0
		6	194	23	0	0	0	0	0	0
	N3	5	195	23	0	0	0	0	0	0
		9	191	38	0	0	0	0	0	0
LIRI	N1	50	150	275	32	168	130	11	189	50
		56	144	342	48	152	218	17	183	63
	N2	48	152	238	29	171	128	12	188	65
		53	147	310	47	153	193	13	187	53
	N3	55	145	296	39	161	207	18	182	70
		47	143	272	35	165	198	14	186	68
EDF	N1	56	144	259	47	153	160	37	163	158
		50	150	308	42	158	173	35	165	163
	N2	48	152	202	46	154	181	46	154	202
		34	166	200	35	165	152	42	158	219
	N3	52	148	253	39	161	148	41	159	211
		38	162	200	42	158	187	37	163	198
EHF	N1	42	158	202	6	194	32	19	181	117
		33	167	200	4	196	25	20	180	125
	N2	30	170	198	9	181	35	16	184	112

EMF	N3	43	157	199	8	182	29	17	183	116
		38	162	202	8	182	38	22	178	123
		47	153	198	12	188	40	18	182	120
	N1	53	148	245	25	175	127	27	173	130
		44	156	253	30	170	140	25	175	140
	N2	48	152	222	19	181	90	27	173	135
32		168	243	20	180	118	29	171	138	
N3	46	154	206	35	165	170	26	174	139	
	64	136	270	29	171	138	27	173	142	
EHS	N1	36	164	246	18	182	100	20	180	98
		46	154	214	20	180	110	16	184	83
	N2	55	145	272	23	177	102	18	182	80
		58	142	293	25	175	98	22	178	102
	N3	48	152	229	20	180	100	32	168	88
		50	150	248	22	178	105	30	170	98
EMS	N1	42	158	300	20	180	150	34	166	180
		58	142	366	35	165	145	35	165	175
	N2	67	133	372	38	162	140	42	158	197
		53	147	369	27	172	152	33	167	173
	N3	59	141	380	33	167	130	37	162	190
		58	142	378	36	164	148	40	160	200
FAEARM	N1	39	161	227	18	182	70	20	180	80
		48	152	219	16	184	68	23	177	75
	N2	41	159	249	20	180	73	18	182	70
		42	158	240	19	181	79	19	181	73
	N3	40	160	215	22	178	73	25	175	79
		39	161	266	17	183	70	19	181	71

9.3.2 Produção de nitrito de macrófagos não infectados e infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* *in vitro*.

Código	Concentrações	Concentração de nitrito (µM)					
		Média ± SEM ^a					
		24 h		48 h		96 h	
		Não infectados	infectados	Não infectados	infectados	Não infectados	infectados
Controle		6,22 ± 1,71	6,22 ± 1,71	13,06 ± 4,67	19,06 ± 9,62	6,62 ± 2,30	36,86 ± 3,76
DMSO 0,7%	50 µg/mL	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,39	0,00 ± 0,00
Pentamidina	50 µg/mL	0,00 ± 0,00	17,28 ± 4,43	0,40 ± 0,39	19,62 ± 8,65	0,40 ± 0,39	61,06 ± 1,07
LPS	10 µg/mL	63,30 ± 4,49	73,00 ± 4,45	81,60 ± 21,26	81,78 ± 21,20	92,22 ± 25,39	111,12 ± 5,23

IFN- γ	10 ng/mL	37,60 + 11,38	59,80 + 3,36	45,72 + 10,37	71,82 + 2,21	50,66 + 20,77	96,44 + 1,39
LIRIO	25 μ g/mL	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00
EDF	25 μ g/mL	12,68 + 8,13	8,86 + 5,45	26,20 + 9,03	20,06 + 8,31	34,56 + 12,64	27,26 + 11,39
EHF	12 μ g/mL	2,86 + 0,95	2,36 + 1,44	26,18 + 8,46	2,24 + 0,99	33,34 + 9,39	6,42 + 3,08
EMF	25 μ g/mL	3,60 + 2,40	3,76 + 2,94	8,60 + 3,76	8,04 + 5,00	3,14 + 6,59	10,00 + 6,12
EHS	25 μ g/mL	0,00 + 0,00	6,62 + 5,29	0,00 + 0,00	6,46 + 5,29	0,00 + 0,00	13,60 + 8,34
EMS	25 μ g/mL	0,00 + 0,00	4,08 + 2,50	0,00 + 0,00	2,58 + 1,59	0,00 + 0,00	5,88 + 2,43
FAEARM	25 μ g/mL	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00	0,00 + 0,00

^a Os resultados representam a média de três experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95% \pm SEM, Erro padrão da média.

9.3.3 Produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos.

Código	Concentrações	Concentração de H ₂ O ₂ (μ M)
		Média \pm SEM
Controle		26,75 \pm 1,79
DMSO 0,7%	50 μ g/mL	38,00 \pm 2,16
PMA	20 nM	85,00 \pm 4,01
LIRIO	25 μ g/mL	54,75 \pm 1,25
EDF	25 μ g/mL	40,75 \pm 7,58
EHF	12 μ g/mL	55,00 \pm 5,58
EMF	25 μ g/mL	42,25 \pm 7,86
EHS	25 μ g/mL	44,75 \pm 2,46
EMS	25 μ g/mL	34,00 \pm 2,38
FAEARM	25 μ g/mL	32,00 \pm 2,34

^a Os resultados representam a média de três experimentos realizados em duplicata com intervalo de confiança de 95% \pm SEM, Erro padrão da média

9.4 ATIVIDADE *IN VIVO*

9.4.1 Peso vivo (Kg) de camundongos BALB/c nos pré-tratamentos e pós-tratamentos.

Semanas	Controle				Pentamidina 4 mg/g				Glucantime 100 mg/g			
0	27,400	26,200	26,900	28,200	26,150	26,300	26,080	28,900	30,030	25,910	27,500	27,050
1°	27,843	26,952	27,768	28,683	27,803	27,156	26,732	28,457	28,214	26,734	27,914	27,634
2°	29,179	27,532	29,861	29,734	27,432	28,078	28,132	29,207	29,832	27,078	29,106	29,135
3°	31,415	29,612	31,050	30,028	31,907	30,712	29,765	31,125	31,096	29,131	31,609	30,900
4°	29,972	28,561	29,738	29,437	29,032	28,975	29,654	30,173	30,048	27,327	29,179	29,673
5°	30,073	28,347	30,035	30,079	28,973	29,539	30,187	30,692	30,834	28,079	29,235	29,975
2° dia de tratamento	30,972	28,285	30,678	30,983	29,475	29,153	30,228	30,791	30,287	28,153	29,535	30,742
3° dia de tratamento	30,914	28,591	29,607	29,583	28,492	29,078	29,660	30,067	30,376	28,452	29,983	30,570
4° dia de tratamento	31,472	28,930	29,708	30,279	28,503	29,691	29,976	30,466	30,475	28,652	30,041	30,322
5° dia de tratamento	31,158	29,229	30,016	30,351	28,512	29,091	30,222	29,935	30,384	28,793	30,440	30,182
6° dia de tratamento	30,876	28,914	29,627	30,162	28,330	29,801	29,630	29,715	30,150	28,903	29,705	29,914
7° dia de tratamento	31,706	29,896	30,022	31,094	28,380	28,938	29,381	29,286	30,862	29,026	30,133	30,987
6°	31,046	28,482	29,933	30,908	28,148	28,935	29,701	29,323	31,029	29,662	30,432	30,953
9° dia de tratamento	31,120	28,509	29,658	30,145	28,742	28,816	29,934	30,654	31,493	29,867	30,468	30,634
10° dia de tratamento	30,907	28,032	29,646	30,019	28,368	28,741	30,256	30,133	31,194	29,383	30,108	30,629
11° dia de tratamento	31,146	27,805	30,929	30,856	28,984	29,642	30,419	30,775	32,581	29,747	30,652	31,495
12° dia de tratamento	31,506	28,154	30,460	30,681	28,876	29,416	29,644	30,516	31,870	29,618	29,523	31,217
13° dia de tratamento	30,539	27,408	30,125	30,549	29,324	29,742	29,770	30,530	31,809	29,253	29,551	30,306
14° dia de tratamento	32,379	28,538	30,492	30,910	29,268	29,379	30,416	30,721	31,538	29,614	29,944	31,428
7°	32,408	28,602	30,498	30,899	29,334	29,572	30,449	30,893	31,692	29,744	29,893	31,799
8°	31,726	30,249	30,659	31,752	29,705	29,824	30,570	30,625	31,308	30,217	29,352	32,504
9°	29,560	29,527	30,674	30,443	33,702	31,247	33,103	29,942	30,108	31,053	30,694	29,957

Semanas	EDF 25 mg/g				EHF 12 mg/g				Sadios EDF 25 mg/g				Sadios EHF 12 mg/g			
0	23,062	23,162	26,860	20,917	27,405	21,036	24,455	26,052	24,21	22,362	22,512	20,080	25,097	24,464	24,09	30,026
1°	23,470	24,117	28,734	21,973	27,335	23,698	24,313	26,037	24,973	22,913	23,117	21,332	25,617	24,713	24,472	29,473
2°	25,132	25,973	29,478	23,092	27,548	24,618	25,134	26,282	26,182	23,738	24,089	21,737	27,482	26,398	26,094	29,432
3°	28,366	29,960	32,106	27,312	30,681	27,032	27,095	29,701	29,186	27,321	26,590	24,075	30,040	30,703	30,495	32,620
4°	27,303	28,472	30,655	26,478	28,673	25,987	26,173	27,642	27,193	25,037	22,973	23,078	29,073	28,773	27,908	30,173
5°	28,182	29,037	29,735	25,147	28,804	26,397	26,438	27,543	30,732	29,157	25,882	27,091	29,315	29,197	28,473	29,681
2° dia de tratamento	28,562	28,673	30,486	26,076	29,581	26,932	26,873	28,224	28,731	25,182	27,503	24,025	29,381	29,793	29,539	30,384
3° dia de tratamento	29,371	28,793	31,084	26,452	29,604	27,142	26,091	29,327	29,462	26,093	27,581	24,319	29,671	29,520	30,177	31,652
4° dia de tratamento	27,640	28,105	29,237	25,703	28,214	26,652	26,743	28,069	28,829	26,032	26,945	26,196	29,318	29,023	29,714	30,150
5° dia de tratamento	28,312	29,473	30,290	26,483	29,475	26,691	27,023	28,533	29,952	26,901	27,023	24,068	30,099	29,879	29,203	29,846
6° dia de tratamento	28,236	29,124	30,416	25,409	29,433	26,584	26,632	28,481	29,876	26,310	25,853	22,960	30,858	29,650	29,618	30,553
7° dia de tratamento	28,446	29,048	30,395	25,086	29,855	26,724	27,080	28,238	29,876	25,602	25,012	24,260	30,190	29,947	29,028	29,932
6°	28,715	29,325	30,946	25,615	29,776	26,854	27,363	28,352	29,324	26,186	26,447	26,635	30,442	30,035	29,296	30,591
9° dia de tratamento	28,941	29,076	30,167	26,155	29,182	27,025	26,874	28,658	29,652	27,322	27,195	24,144	29,758	29,840	29,753	30,002
10° dia de tratamento	28,706	29,577	31,028	26,354	29,853	27,110	26,814	28,381	29,874	26,133	25,357	25,154	30,145	29,973	29,977	30,636
11° dia de tratamento	29,192	29,581	31,054	27,190	30,103	27,790	27,449	28,793	29,685	27,640	27,581	25,016	30,534	30,010	30,387	30,054
12° dia de tratamento	28,560	29,867	30,216	26,791	29,995	27,813	26,914	28,892	29,846	27,205	27,737	24,935	30,110	29,860	29,570	29,044
13° dia de tratamento	28,980	29,975	30,960	26,496	29,810	27,658	26,773	29,130	29,024	27,213	28,165	24,350	30,150	30,521	29,794	29,571
14° dia de tratamento	28,322	30,890	30,022	27,584	29,822	29,547	28,153	29,818	30,927	28,015	28,801	24,879	30,254	30,018	29,258	30,120
7°	28,909	30,853	31,018	27,932	30,018	29,794	28,995	29,925	30,857	28,954	28,936	25,207	30,594	30,937	29,893	30,334
8°	28,801	30,126	29,962	27,393	30,335	28,047	26,816	28,954	30,231	27,443	29,054	25,118	30,488	30,523	30,042	32,136
9°	29,504	30,278	31,667	28,504	30,058	28,446	26,502	28,931	30,908	27,896	29,692	25,843	29,975	29,483	29,874	31,657

Semanas	Controle Lanette				Pomada EDF				Pomada EHF			
0	26,250	25,300	21,900	24,800	24,839	29,211	27,672	25,030	26,602	25,760	25,194	27,530
1°	29,906	28,613	27,743	26,653	24,873	29,714	27,032	25,154	27,463	26,734	26,914	28,225
2°	30,192	28,420	27,092	24,837	26,113	30,478	28,732	26,478	29,032	27,659	28,358	28,063
3°	32,076	29,014	30,590	29,227	29,978	32,900	31,300	29,715	32,620	31,050	32,413	31,570
4°	30,972	28,293	29,578	27,497	26,734	30,879	29,532	27,489	29,079	27,352	28,213	28,364
5°	32,837	29,782	30,435	28,873	27,853	30,792	29,987	28,035	30,683	29,087	30,126	30,094
2° dia de tratamento	32,093	29,655	30,201	28,057	27,530	31,697	30,193	28,602	30,657	29,193	29,226	29,730
3° dia de tratamento	31,472	28,734	29,912	28,391	27,855	31,602	29,735	27,688	29,652	28,793	29,014	29,542
4° dia de tratamento	30,875	27,913	29,148	28,036	27,246	31,143	29,952	27,831	30,408	29,973	29,381	29,497
5° dia de tratamento	31,782	27,400	30,092	28,475	27,751	31,482	30,265	28,382	30,501	29,164	29,720	30,010
6° dia de tratamento	30,879	26,991	30,122	28,327	27,556	30,887	29,860	27,951	30,385	29,154	29,295	29,630
7° dia de tratamento	31,263	26,675	30,754	28,321	27,583	30,965	30,186	28,326	30,446	29,831	29,923	30,078
6°	31,605	26,714	30,432	27,667	27,692	31,038	30,184	28,630	30,219	28,593	29,162	28,415
9° dia de tratamento	31,502	26,643	30,656	28,468	27,709	31,406	30,294	28,503	30,788	29,051	29,591	30,126
10° dia de tratamento	31,814	26,799	31,062	28,709	28,108	31,096	30,699	28,533	30,814	29,253	30,016	30,384
11° dia de tratamento	32,779	28,849	32,437	29,914	28,342	31,329	30,752	29,732	31,791	30,015	30,443	30,692
12° dia de tratamento	31,352	28,174	31,376	29,136	28,493	31,018	30,717	28,926	31,619	29,964	30,645	31,233
13° dia de tratamento	31,801	28,285	32,134	28,778	28,154	31,167	31,451	29,925	31,980	30,174	30,416	30,768
14° dia de tratamento	31,628	28,226	31,590	28,855	28,325	31,618	31,794	29,180	32,106	30,125	30,265	30,974
7°	31,703	28,119	31,600	28,898	28,404	31,775	31,782	29,189	32,304	30,216	30,304	30,997
8°	33,434	30,221	33,127	30,025	28,624	31,873	31,835	29,636	32,402	30,655	30,428	31,106
9°	31,654	30,128	29,683	32,307	28,687	31,146	31,523	29,468	31,917	31,048	30,108	29,983

9.5 REGISTRO DE COLETA NO IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 17085-1		Data da Emissão: 11/08/2008 17:52
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2731540	Nome: Maria Lúcia Belém Pinheiro	CPF: 005.152.642-53

Ressalvas

- 1 As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
- 2 A autorização ou licença do Ibama não exime o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades de pesquisa forem realizadas em área de domínio privado; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva; V) da Fundação Palmares, quando as atividades de pesquisa forem executadas em áreas de Quilombolas; VI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, quando da entrada e saída de material biológico do País; VII) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VIII) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, entre outras.
- 3 O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
- 4 É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
- 5 Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 2211/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
- 6 A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites. Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
- 7 Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
- 8 Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
- 9 As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
FILO	Gimnospermae, Angiospermae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47924733



Página 1/1

9.6 CERTIFICADO DO COMITÉ DE ÉTICA (CEUA/IPEPATRO)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo projeto 2011/1 registrado sob no 2011/1 na folha 8 do livro 1 da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade da Dra. Izaltina Silva Jardim coordenadora do projeto intitulado "Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais amazônicas", está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 28 de abril de 2011.

Porto velho, 28 de abril de 2011.

Relatores:

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

Juliana Pavan Zuliani
Dra. Juliana P. Zuliani
Presidente da CEUA IPEPATRO

-Ms. Luiz Herman Soares Gil

Luiz Herman Soares Gil