



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DA ZERUMBONA**

ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL

**MANAUS
Março, 2018**

ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DA ZERUMBONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia para Saúde.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, PhD
Coorientador: Ana Flávia da Silva Chagas, MSc.

**MANAUS
Março, 2018**

B823a Brasil, Anny Maiza Vargas
Avaliação in vitro da atividade antileishmania da zerumbona : in vitro da atividade antileishmania da zerumbona / Anny Maiza Vargas Brasil . 2018
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco Pereira
Coorientadora: Ana Flávia da Silva Chagas
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmania. 2. Zerumbona. 3. In Vitro. 4. Produtos Naturais. I. Pereira, Antonia Maria Ramos Franco. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DA ZERUMBONA**

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por
ANNY MAÍZA VARGAS BRASIL e aprovada pela Banca Avaliadora em ___/___/___.

Banca Examinadora :

Dra. Antonia Maria Ramos Franco
Orientadora

Prof. 2

Prof. 3

DEDICATÓRIA

A DEUS, a razão de tudo, o arquiteto de tudo, o dono da minha vida

Aos meus pais e familiares, que sempre me deram asas para ir além de tudo quanto eu poderia imaginar que conquistaria,

Aos meus pais espirituais, pelas forças, orientações e todo cuidado e amor

A família Ágape, minhas lindas filhas pela compreensão,

Aos amigos e parceiros dessa caminhada,

A todas as pessoas indispensáveis na minha vida,

Esse mérito é nosso!

AGRADECIMENTOS

Deus, bom mesmo é não precisar de muitas palavras, ou simplesmente de palavras, seria insuficiente para te descrever, você é assim, profundo, sempre novo, nunca é só o que aparenta e há sempre mais de você em tudo. Você me inspira Deus, a você a minha gratidão por tudo!

A minha orientadora Dra. Antonia Maria Ramos Franco, pela oportunidade de ingressar na pesquisa, a todos os ensinamentos compartilhados em cada momento de orientação, pela amizade, cuidado, atenção, por todas às vezes que disse “vai dar tudo certo” mesmo quando estávamos reiniciando um novo projeto, meu **MUITO OBRIGADA com uma carga enorme de gratidão**.

A minha coorientadora MSc. Ana Flávia Chagas, por me enxergar perdida pesando substâncias naquele dia comum e me fazer apaixonar pelo trabalho que desenvolvemos, pela paciência em ensinar, pela parceria em noites e finais de semana no laboratório, pelas palavras em dias de choro mas também pelas risadas frouxas em dias felizes, pelas gordices hahaha porque a gente merece, pelas 1001.. versões de correções intermináveis, enfim pela amizade que foi o maior presente, esse trabalho é tanto meu quanto seu, **agradeço imensamente**, não teria chegado ao fim sem a sua grande ajuda.

A Dra. Maricleide Naiff, pelos conselhos, ensinamentos e por sempre estar disposta a nós ouvir e ajudar no que for preciso.

Ao Msc. Pedro Rael, pela diversidade de conhecimento sempre transferido com uma leve pitada de bom humor, sempre que eu precisar de uma informação sei que posso busca-la com você. Pela amizade, parceria, caronas e por barganhar o meu dindin.

À Dra. Fabiane Veloso Soares, pelos ensinamentos no início dessa fase, por todas as considerações no trabalho para qualificar, pela parceria e amizade.

Ao Bruno Jensen e Sabrina pela amizade desde o início do mestrado, por ser guia turístico no Rio de Janeiro, com certeza momentos que vou levar no meu coração, eternas crianças do mestrado.

Ao grupo do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas em especial a **Dra. Francimeire Gomes, Ana Cleide e Lourival Maciel**, por todo suporte, colaboração e ensinamentos durante o mestrado.

A Theodora Maria e Thaís Pinto alunas de iniciação científica que me acompanharam na pesquisa e que vou levar pra vida, **obrigada**.

Aos meus pais Adonias e Nelci, por serem a minha vida, meu maior exemplo e por me ensinarem a ter princípios. Todos os dias enfrentamos o gigante da saudade, porém mesmo a Km de distância vocês conseguem se fazer tão presentes, me instruindo, me aconselhando, me dando amor e carinho e incentivando todas as loucuras dessa pequena mulher para correr atrás dos seus objetivos. Isso é para vocês, é NOSSO!! A vocês todo o meu amor!

A minha irmã Theyla Dalila e todos os meus familiares, pela força, amizade, orientações e conselhos, por me fazerem rir quando tudo parecia pesado demais, por sempre e a todo o momento acreditarem em mim.

As meus Tios Euvaldo, Edimar e Rosane, que me acolheram com tanto amor e cuidado e sempre me deram suporte para que aqui em Manaus eu pudesse cumprir meus objetivos.

A Família que o senhor me presentou aqui em Manaus, que não trabalham diretamente comigo, mas que estiveram do meu lado quando os resultados estavam dando certo e vibravam comigo, assim como nos dias difíceis limpando as lágrimas, sendo um refúgio e arrancando sorrisos, cuidando de mim como filha, outros como irmãos, outros como grandes amigos, não irei me atrever a citar nomes pois os especias já tem esse reconhecimento. Levo vocês eternamente na minha vida.

A UFAM/PPGBiotec, ao INPA/Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas e a FAPEAM pela chance e ferramentas que permitiram chegar ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

A todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente nesses dois anos minha **ETERNA GRATIDÃO**.

EPÍGRAFE

Pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós, diz o Senhor; planos de paz, e não de mal, para vos dar um futuro e uma esperança.
Jeremias 29:11

Palavras dele (DEUS) para mim no dia que tudo começou

“És minha força Senhor... Meu Rochedo... És Meu amparo em teus braços, segura estou... Digo Sim à Vida... Digo Sim a tudo que me destes...”

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Aproximadamente, 98 já notificaram a doença, acometendo 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Os pacientes com LTA apresentam quadro clínico diferenciado, manifestando-se na forma cutânea e mucosa. O tratamento da doença no Brasil faz o uso das drogas de primeira e segunda escolha, sendo representados pelos antimonais pentavalente e as demais drogas incorporadas como tratamento no decorrer dos anos. É necessário para determinar a terapêutica a ser aplicada considerar as características clínicas das lesões, a susceptibilidade aos medicamentos, a localização geográfica em que a infecção foi adquirida e a espécie de *Leishmania* infectante. Apesar da eficácia desses fármacos, eles exibem alta toxicidade, efeitos colaterais adversos, resistência a algumas espécies e forma de administração requerida parenteral. Nesse contexto, faz-se necessário a busca por novas composições que apresentem atividade antileishmania que demonstre eficácia e segurança, facilitando o tratamento da doença. Estudos com a zerumbona, um sesquiterpeno encontrado em *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm., demonstraram que esse composto possui múltiplas propriedades biomédicas, diante disso tem despertado grande interesse da comunidade científica na possibilidade de usar esse composto para tratamento de leishmaniose cutânea. Neste estudo a zerumbona da Sigma-aldrich foi testada com o objetivo de avaliar a atividade antileishmania *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais murinos. Para avaliação da atividade da zerumbona contra formas promastigotas os parasitas foram expostos à substância em estudo nas concentrações de 0.250 - 0.015 mg/mL, durante 48 a 72 horas para *L.(V.) guyanensis* e 72 a 96 horas para de *L. (L.) amazonensis*. Foi avaliada a atividade citotóxica frente a macrófagos peritoneais murinos. Para avaliação das formas amastigotas, macrófagos peritoneais murinos foram submetidos à infecção com formas promastigotas das espécies em estudo e posteriormente foram expostos a zerumbona nas concentrações 0.250 0.031 mg/mL por 48 a 72 horas para *L.(V.) guyanensis* e 72 a 96 horas para *L. (L.) amazonensis* a fim de avaliar a morfologia celular e determinar a taxa de infecção. Os bioensaios indicaram que a zerumbona apresenta toxicidade para o modelo celular em estudo nas concentrações de 0.250 mg/mL e 0.125 mg/mL e embora o mecanismo de ação não seja definido sugere-se que seja através da condensação do DNA ou stresse oxidativo o que leva a célula a sofrer apoptose. Apresentou atividade antileishmania promissora contra formas promastigotas das duas espécies com CE₅₀ capaz de reduzir mais que 50% do crescimento dos parasitas em todo o período de incubação. Os bioensaios contra formas amastigotas para as espécies *L. (L.) amazonensis* (72 e 96h) e *L. (V.) guyanensis* (48 e 72h) apresentaram atividade antileishmania sendo avaliada inibição de até 50 % da taxa de infecção para ambas as espécies. Pela primeira vez é mostrada a atividade da zerumbona contra fromas promastigotas e amastigotas das espécies alvo desse estudo sendo promissor para ambas a espécies, o que nos encoraja para continuar com os testes *in vivo* para o tratamento de LTA.

Palavras-chave: *Leishmania*; zerumbona; *in vitro*; produtos naturais.

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a non-contagious infectious disease that affects the protozoa of the genus *Leishmania*. Approximately 98 have already reported a disease, affecting 12 million people worldwide. The patients with ATL in the clinical setting differed, manifesting in cutaneous and mucosal form. The treatment of the disease in Brazil makes use of drugs of first and second choice, being represented by pentavalent antimonials and like other drugs as the treatment over the years. It is a possibility of attention to be considered as a clinical condition for lesions, a possibility for drugs, a geographical location in which a species of infectious *Leishmania* was captured. Since then, the drugs have high toxicity, are adverse adverse, some species are needed and are required for parenteral administration. In this context, it is necessary to search for new compositions that have antileishmania activity that demonstrate e-mail and security, facilitating the treatment of the disease. Studies with a zerumba, a sesquiterpene found in *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm., Demonstrated a great accumulation of biomedical properties, focused on a great interest of the scientific community in the possibility of the use of talent for the treatment of cutaneous leishmaniasis. This study is the study of the sigma-aluminum assay in the antigenishmania in antileishmaniasis in the shigellostigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* and the cytotoxicity against murine peritoneal macrophages. To evaluate the activity of zerumba against promastigote forms of parasites were exposed to the material under study at concentrations of 0.250 - 0.015 mg / mL, for 48 to 72 hours for L. (V.) *Guyanensis* and 72 to 96 hours for L. (L.) *amazonensis*. A cytotoxic activity against murine peritoneal macrophages was evaluated. For the evaluation of the amastigotes, peritoneal macrophages, the murine ones were submitted to infection by the promastigote forms of the species under study and were exposed at concentrations of 0.250 - 0.031 mg / ml for 48 to 72 hours for L. (V.) *Guyanensis* and 72 to 96 hours for L. (L.) *amazonensis* is an evaluation of cell morphology and determination of infection rate. Bioassays indicated that zerumbone shows toxicity to the cellular model under study at concentrations of 0.250 mg / mL and 0.125 mg / mL. Although the mechanism of action is not defined, it is suggested that DNA condensation or oxidative stress lead the cell to undergo apoptosis. It promotes antileishmania activity against promastigotes of both species with EC50 capable of reducing more than 50% of parasite growth during the entire incubation period. The bioassays against amastigote forms for the species L. (L.) *amazonensis* (72 and 96h) and L. (V.) *guyanensis* (48 and 72h) presented antileishmania activity and the inhibition of up to 50% of the infection rate was evaluated for both species. For the first time, zerumbone activity against promastigotes and amastigotes of the target species of this study has shown promise for both species, which encourages us to continue the in vivo tests for ACL treatment.

Keywords: *Leishmania*; zerumbone; *in vitro*; natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania</i> sp	23
Figura 2. Inseto vetor da Leishmaniose, gênero <i>Lutzomyia</i> sp	25
Figura 3. Ciclo de transmissão da Leishmaniose.....	27
Figura 4. Polimorfismo das lesões da Leishmaniose Cutânea. A) Lesão tipo pápula; B) Lesão em placa; C) Úlcera franca; D) Impetigoide; E) Ectimatoide; F) Nodular; G) Úlcero-vegetante; H) Lesão verrucosa.	29
Figura 5. <i>Zingiber zerumbet</i> (A), rizomas (B) e flores (C).....	38
Figura 6. Estrutura química da zerumbona.....	39
Figura 7. Curva de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i> (IMHOM/BR/2009/IM5584) (A) e <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>guyanensis</i> (MHOM/BR/75/M4147) (B). Os valores expressam a média de três determinações e estatisticamente significativos ($p < 0.05$).....	47
Figura 8. Atividade da zerumbona (0.250 0.015 mg/mL) frente às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i> no período de 24, 48, 72 e 96 horas em comparação aos controles: DMSO (2%), Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo. Letras diferentes representam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0.05$).....	49
Figura 9. Atividade da zerumbona (0.250 0.015 mg/mL) frente às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>guyanensis</i> no período de 24, 48 e 72 horas em comparação aos controles: DMSO (2%), Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo. Letras diferentes apresentam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0.05$)	52
Figura 10. Morfologia dos macrófagos peritoneais murinos (BALB/c, <i>Mus musculus</i>) após 48, 72 e 96 horas de tratamento com zerumbona. A, B e C --controle positivo com macrófagos não tratados. D, E e F - macrófagos tratados com DMSO (2%). G, H e I ---macrófagos tratados com Glucantime® (4 mg/mL). J, K e L macrófagos tratados com zerumbona (0.250 mg/mL). M, N e O - macrófagos tratados com zerumbona (0.125 mg/mL). P, Q e R -- macrófagos tratados com zerumbona (0.062 mg/mL). S, T e U macrófagos tratados com zerumbona (0.031 mg/mL). 1000x.....	56
Figura 11. Macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584) após 72 e 96 horas de tratamento com a zerumbona. A e B macrófagos infectados e não tratados (controle negativo). C e D macrófagos infectados expostos ao DMSO (2%). E e F - macrófagos infectados expostos ao Glucantime® (4 mg/mL). G e H macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.250 mg/mL). I e J - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.125 mg/mL). K e L macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.062 mg/mL). M e N - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.031 mg/mL). 1000x	58

Figura 12. Efeito da zerumbona em amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), em 72 e 96 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação aos controles: DMSO (2%) e Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo (macrófagos infectados e não tratados). Letras diferentes representam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). *= não foi possível quantificar, células viáveis em número insuficiente60

Figura 13. Macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/2009/IM4147) após 48 e 72 horas de tratamento com a zerumbona. A e B macrófagos infectados e não tratados (controle negativo). C e D macrófagos infectados expostos ao DMSO (2%). E e F - macrófagos infectados expostos ao Glucantime® (4 mg/mL). G e H macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.250 mg/mL). I e J - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.125 mg/mL). K e L macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.062 mg/mL). M e N - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.031 mg/mL). 1000x.....63

Figura 14. Efeito da zerumbona em amastigotas intracelulares de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/2009/M4147), em 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação aos controles: DMSO (2%) e Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo (macrófagos infectados e não tratados).. Letras diferentes representam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). *= não foi possível quantificar, células viáveis em número insuficiente65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Casos novos de LTA entre os anos de 2010 a 2016, nas regiões do Brasil.....30
- Tabela 2. Valores de CE₅₀ (mg ± Desvio Padrão) da zerumbona após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 48
- Tabela 3. Valores de CE₅₀ (mg ± Desvio Padrão) da zerumbona após 24, 48 e 72 horas de incubação com promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* 51
- Tabela 4. Efeito citotóxico da zerumbona em macrófagos peritoneais murinos por 48, 72 e 96 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica (Alamar Blue®).....54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar de acordo com a forma clínica e espécie de <i>Leishmania</i> infectante.....	34
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius
®marca registrada
% por cento

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EV - Endovenoso

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IV - Intravenoso

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LD - Leishmaniose Cutânea Disseminada

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

MS - Ministério da Saúde

NADPH - fosfato de di-hidrogenofosfato de adenina dinucleótido nicotinamida.

OMS - Organização Mundial de Saúde

RPMI 1640 - Meio Roswell Park Memorial Institute Medium 1640

Sb³⁺ - Antimônio Trivalente

Sb⁵⁺ - Antimônio Pentavalente

SBFi- Soro Bovino Fetal inativado

WHO - World Health Organization

7. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Histórico da doença	21
2.2. O gênero <i>Leishmania</i>	23
2.3. Insetos Vetores e Hospedeiros Vertebrados	25
2.4. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	26
2.5. Manifestações Clínicas da LTA	27
2.6. Epidemiologia da Leishmaniose	29
2.7. Tratamento da LTA	30
2.7.1. Antimoniais pentavalentes (Sb ⁵⁺)	31
2.7.2. Isetionato de Pentamidina (Pentacarinat [®])	32
2.7.3. Anfotericina B (Abelcet [®])	32
2.7.4. Pentoxifilina	33
2.8. Utilização de produtos naturais (PN) na indústria farmacêutica	35
2.8.1. Terpenos	36
2.9. Considerações gerais sobre zerumbona	37
2.9.1. <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Roscoe ex Sm	37
2.9.2. Zerumbona	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo Geral	40
3.2. Objetivos Específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Substâncias utilizadas no estudo	41
4.2. Atividade <i>in vitro</i> contra formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (L.) amazonensis e <i>Leishmania</i> (V.) guyanensis	41
4.2.1. Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária	41
4.2.2. Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (L.) amazonensis e <i>Leishmania</i> (V.) guyanensis	42
4.2.3. Bioensaio para determinação da atividade antileishmania e da concentração efetiva de 50% (CE ₅₀) da zerumbona	42
4.3. Ensaio de citotoxicidade e atividade <i>in vitro</i> contra formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	43
4.3.1. Obtenção de macrófagos peritoneais murinos	43
4.3.2. Atividade citotóxica em macrófagos peritoneais murinos	44

1.4.3.3. Ensaio morfológico de citotoxicidade da zerumbona sobre macrófagos peritoneais murinos.....	18
INTRODUÇÃO.....	22
SUMÁRIO.....	22
4.4. Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	47
5.2. Avaliação da atividade da zerumbona contra formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	48
5.3. Avaliação da atividade da zerumbona contra formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	50
5.4. Ensaio de citotoxicidade da zerumbona pelo método colorimétrico de Alamar Blue® em macrófagos peritoneais murinos	53
5.5. Avaliação da morfologia de macrófagos peritoneais murinos tratados com zerumbona.....	55
5.6. Atividade da zerumbona contra amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	57
5.7. Atividades da zerumbona contra amastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	61
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	73
8. PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas e não contagiosas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O agente etiológico causador da infecção é transmitido pela picada de insetos infectados, conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), sendo *Lutzomyia* um dos gêneros de maior importância possuindo aproximadamente 32 espécies com capacidade de transmitir leishmanioses nas Américas (BASTOS, 2012; BLANCO; NASCIMENTO - JÚNIOR, 2017).

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 30 espécies, das quais nas Américas 11 espécies dermatrópicas foram descritas como causadoras de leishmanioses em humanos, apresentando características morfológicas, fisiológicas e epidemiológicas diferentes, o que leva ao desenvolvimento de doenças com formas clínicas diferenciadas, sendo elas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que acomete pele e mucosas, e a Leishmaniose Visceral (LV) que vem a ser uma doença sistêmica que acomete fígado, baço, medula óssea e linfonodos (BRASIL, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose está entre as endemias consideradas prioritárias no mundo, sendo um dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento. Aproximadamente, 98 países já notificaram a doença, acometendo 12 milhões de pessoas e de 350 milhões que estão expostas a doença em todo o mundo (GOSH et al., 2017).

No Brasil, a LTA é considerada um problema de saúde pública por ser altamente endêmica (LIMA, 2014) e considerada uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, apresentando ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões. Em 2016, foram registrados no Brasil 12.690 novos casos, com destaque para a região norte (5.075 casos) e nordeste (3.166 casos). No mesmo período, foram reportados 828 novos casos no Amazonas, sendo classificado o terceiro estado da região norte com maior número de notificações para LTA (SINAN, 2017; BRASIL, 2017).

O tratamento das diferentes formas clínicas da leishmaniose durante décadas utilizou os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) como drogas de primeira escolha (LIMA, 2014). Atualmente no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) preconiza para

determinação da terapêutica, considerar as características clínicas das lesões, a susceptibilidade aos medicamentos, a localização geográfica em que a infecção foi adquirida e a espécie de *Leishmania* infectante (BRASIL, 2017).

Os fármacos utilizados atualmente apresentam eficácia limitada, visto que exibem alta toxicidade, estão relacionados a uma série de efeitos adversos, além de uso parenteral, tempo de cura prolongado e o custo elevado no tratamento. É relevante destacar que o maior número de casos ocorre em zonas rurais, o que dificulta a aplicação parenteral e o acompanhamento dos efeitos colaterais; há também a dificuldade quanto ao deslocamento diário para a área hospitalar que representa um empecilho a condução clínica adequada ao paciente, muitas vezes levando a interrupção ou abandono do tratamento (BASTOS et al., 2016; PENNA et al., 2011).

Diante dessas limitações a OMS recomenda o incentivo à busca por novos medicamentos e tratamentos com drogas alternativas. Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para obtenção de novas formulações farmacêuticas, partindo da utilização de produtos naturais, sintéticos ou semissintéticos, que apresentem efeitos adversos e custo de produção menor que os atuais fármacos utilizados (LIMA, 2014; SUNDAR; CHAKRAVATY, 2015). Atualmente os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MENEGATTI et al., 2001).

A zerumbona é um sesquiterpeno presente em muitos alimentos naturais consumidos hoje, sendo encontrado principalmente nos rizomas e óleos essenciais da *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex. Sm., uma espécie de planta conhecida popularmente como gengibre amargo (KITAYAMA et al., 2001).

Estudos recentes têm revelado várias propriedades biológicas deste composto fitoquímico, como propriedades anti-inflamatórias, antiviral, antitumoral, antioxidante, imunomoduladora, antialérgico, antidiabética e antimicrobiana (TAKADA; MURAKAMI; AGGARWAL, 2005; RAHMAN et al., 2014) e dentre elas atividade antileishmania contra a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani* agente etiológico causador da leishmaniose visceral no Velho Mundo (SINGH et al. 2014; MUKHERJEE et a. 2015).

Por se tratar de um composto dietético natural que possui múltiplas propriedades biomédicas, há um grande interesse da comunidade científica em

estudar a zerumbona para o tratamento de LTA, visto que não se tem descrito na literatura estudo desse composto para o tratamento dessa enfermidade, assim como, de ensaios biológicos com espécies de leishmanias isoladas na América do Sul (NAKAMURA et al., 2004; TZENG et al., 2014; CHIA et al., 2016).

Considerando que o tratamento para leishmaniose ainda é um grande desafio terapêutico, faz-se necessário ampliar os esforços na busca por novas drogas. Sendo assim, pretende-se com esse estudo avaliar a atividade *in vitro* antileishmaniana da zerumbona contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* e avaliar a citotoxicidade frente a macrófagos peritoneais murinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da doença

A leishmaniose acompanha a história do homem desde tempos remotos, havendo relatos de sua ocorrência desde o século I d.C, embora não tivessem conhecimento de quais eram os agentes etiológicos (BASANO et al., 2004). Estudos realizados em vasos de cerâmica pré-colombianas, feitos por índios do Peru na América, datados de 400 a 900 anos d.C, demonstraram a ocorrência de uma e espúndia, hoje conhecidas como a forma cutânea e mucosa da doença, respectivamente. Os vasos apresentavam figuras de pessoas saudáveis e com mutilações de nariz e lábios, característicos da doença, embora, primeiramente tenham sido confundidas com sífilis (VALE; FURTADO, 2005).

A primeira referência de leishmaniose no Brasil é citada em relatórios feitos por cronistas viajantes entre 1774 e 1787, no qual descreveram a experiência de um médico residente no Amazonas, a respeito de uma praga de mosquito, cuja picada provocava o surgimento de úlceras, sem descrever de fato a doença (COSTA, 1992; FURUSAWA; BORGES, 2014).

Contudo, a referência considerada mais segura da doença no país é documentada na obra Pastoral Religiosa-Político Geographico em 1827, citada na tese de doutorado de Julio Cesar Tello onde apresenta a descrição da viagem do missionário Frey dom Hipólito Sanchez Rangel de Fayas y Quiros que relata a existência de indivíduos com feridas na boca, nariz e úlceras nos braços e pernas, relacionadas à picada de insetos na região Amazônica (FURTADO; VALE, 2005).

O britânico David Douglas Cunningham em 1885 na Índia foi o primeiro a observar o parasita do gênero *Leishmania*, no qual descreveu formas amastigotas em casos de LV (FURUSAWA; BORGES, 2014). Alguns anos depois, em 1898 Borovsky na Rússia encontrou esses parasitas em lesões do botão do oriente (calazar) e descreve-os como parasitas diminutos (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003; NEVES, 2009).

Somente em 1903, na Índia, foi descrito o agente causador do calazar por William Leishman e Charles Donovan, que recebeu o nome de *Piroplasma donovani* nomeado por Laveran e Mesnil, o que não durou muito tempo, pois Ronald Ross

criou o gênero *Leishmania* e a espécie passou a ser chamada de *Leishmania donovani*, em 1906 esses parasitas foram denominados *L. tropica* (NEVES, 2009).

No Brasil, em 1855 Cerqueira identificou a doença clinicamente como Botão de Biskra. Em 1908, a doença passou a ser conhecida como úlcera de Bauru, devido ao grande número de casos que chegaram a Santa Casa de São Paulo, oriundos principalmente da cidade de Bauru. Contudo, somente em 1909 a natureza leishmaniótica das lesões foi confirmada por Lindenberg e Carini - Paranhos ao identificar formas amastigotas em lesões cutâneas de indivíduos com úlcera de Bauru da cidade de São Paulo, idênticas a *L. tropica* descrita no velho mundo (BASANO; CAMARGO; ARANHA, 2004; LAINSON, 2010).

No entanto, em 1911, Gaspar Vianna ao investigar o parasita de lesões cutâneas de um paciente do interior de Minas Gerais, concluiu que a morfologia das amastigotas diferia da *L. tropica*, denominando o parasita de *Leishmania braziliensis*. Em abril de 1912, Vianna apresenta o primeiro caso de cura da leishmaniose tegumentar com a utilização do tártato emético (BASANO; CAMARGO; ARANHA, 2004; LAINSON, 2010). Em 1915, com exceção dos estados ao sul de São Paulo, os demais estados brasileiros foram observados com casos de leishmaniose tegumentar (FURUSAWA; BORGES, 2014).

Por muitos anos acreditou-se que todos os casos de LTA eram provenientes unicamente da *L. braziliensis*, mas com os avanços dos estudos biológicos e epidemiológicos outras espécies foram descritas e em 1961, Pessôa, um parasitologista brasileiro, listou outras espécies causadoras de leishmaniose tegumentar propondo uma subdivisão da *L. braziliensis* em *braziliensis*, *guyanensis*, *peruviana*, *pifanoi* e *mexicana*. Em 1987, foi feita uma classificação revisada por Laison e Shaw, que criaram o subgênero *Viannia* e *Leishmania* avaliando critérios de desenvolvimento do parasita no intestino do flebotomíneo (BASANO; CAMARGO, 2004; VALE; FURTADO, 2005; LAINSON, 2010).

No Brasil atualmente são conhecidas pelo menos sete espécies que causam a doença em humanos, cada uma apresentando particularidades em relação a vetores, reservatórios, manifestações clínicas, distribuição geográfica, padrões epidemiológicos e resposta terapêutica (VALE; FURTADO, 2005; BRASIL, 2017).

2.2. O gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* descrito em 1903 por Ross é caracterizado por diferentes espécies de protozoários flagelados, unicelulares, com ciclo de vida digenético (heteroxênico), de transmissão vetorial e com ampla distribuição em climas quentes e temperados (FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012; LIMA, 2014). Apresenta morfologia variada com dois estágios evolutivos principais:

- I) Promastigota: forma alongada, com cinetoplasto anterior ao núcleo em formato de grão ou bastão, núcleo arredondado ou oval, flagelo livre e longo emergindo da porção anterior do parasita. Possui dimensões variáveis entre 10 a 40 μm de comprimento e 1,5 a 3,0 μm de diâmetro (Figura 1A) [CASTELLANO, 2005]

- II) Amastigota: forma esférica ou oval, encontrada fora e dentro de macrófagos, com cinetoplasto em forma de bastonete, núcleo grande e arredondado e flagelo curto e interiorizado. Possui dimensões entre 1,5 a 3,0 μm de comprimento e 3,0 a 6,5 μm de diâmetro (Figura 1B) [CASTELLANO, 2005; NEVES, 2009].

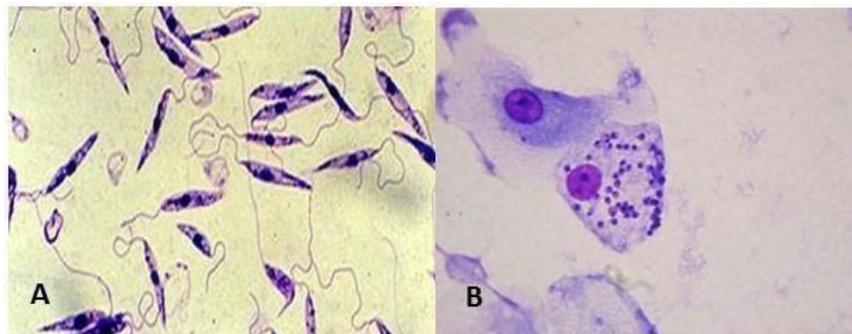


Figura 1. Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* sp.
Fonte: CARVALHO (2011).

Segundo Akhoundi et al., (2016) esses parasitas são classificados sistematicamente em Reino Protista, Classe Kinetoplastea, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania*, no qual é subclassificado em dois subgêneros de acordo com o local em que se desenvolvem no inseto vetor:

- I) Subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987): os parasitas se desenvolvem primeiramente no intestino posterior dos vetores migrando em seguida para o intestino médio e anterior (desenvolvimento peripilário);
- II) Subgênero *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982): os parasitas se desenvolvem predominantemente no intestino médio e anterior (desenvolvimento suprapilário) [AEDO, 2007; LIMA, 2010].

Atualmente, há descrito mais de 30 espécies de *Leishmania* no mundo, das quais mais de 20 acometem o homem, sendo que no Brasil, sete espécies são capazes de causar a forma tegumentar da doença, sendo elas: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (L.) amazonensis* (MONTEIRO, 2009). Embora, sejam quatro as de maior importância no estado do Amazonas (FIGUEIRA, 2013):

- I) *L. (V.) braziliensis*, encontrada em todas as zonas endêmicas do país, sendo a espécie mais prevalente no homem causando lesões cutâneas e mucosas (MONTEIRO, 2009);
- II) *L. (V.) guyanensis*, é considerada a segunda espécie mais prevalente no Brasil, causando múltiplas lesões cutâneas e raramente lesões mucosas (BASANO, 2004; BRASIL, 2017);
- III) *L. (L.) amazonensis*, encontrada de Norte ao Sul do rio Amazonas, sendo a única espécie do subgênero *Leishmania* que causa LTA no Brasil, na qual se manifesta nas formas cutânea, cutânea mucosa e a forma difusa anérgica, ainda sem tratamento conhecido (MONTEIRO, 2009; BRASIL, 2017);
- IV) *L. (V.) naiffi*, encontrada na região Amazônica (Pará e Amazonas) conhecida por causar a leishmaniose de evolução benigna e boa resposta ao tratamento, apresentando lesões ulceradas e pequenas (NAIFF et al., 1991; MONTEIRO, 2009; FIGUEIRA, 2013).

2.3. Insetos Vetores e Hospedeiros Vertebrados

O Brasil possui um clima tropical com extensa área silvestre, favorecendo condições ideais para o desenvolvimento de diferentes espécies de flebotomíneos. Entre as mais de 900 espécies conhecidas, 260 são encontradas no Brasil, das quais mais de 120 são descritas na Amazônia, embora somente 32 espécies sejam consideradas vetores da leishmaniose (BASTOS, 2012).

Os flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito palha, asa dura, birigui, tatuquira entre outros, são insetos de pequeno porte, medindo até 0,5 cm de comprimento, corpo piloso e delgado, portando dois pares de asas que permite se deslocar por pequenos saltos e apresentam atividade noturna (Figura 2). Estão divididos em seis gêneros, sendo os de maior importância o gênero *Lutzomyia* que se encontra no Novo Mundo e o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (BASTOS, 2012; BRASIL, 2017).



Figura 2. Inseto vetor da Leishmaniose, gênero *Lutzomyia* sp.
Fonte: CARVALHO (2011).

Os insetos transmissores das espécies de *Leishmania* são fêmeas adultas que possuem hábitos hematófagos, que necessitam de refeições sanguíneas para possibilitar o desenvolvimento ovariano e posterior maturação de seus ovos, embora assim como os machos também se alimentem de fontes de açúcar para produzir energia e manter a homeostasia (LIMA, 2014).

Em geral os flebotomíneos se alimentam de sangue em diferentes hospedeiros, embora seja caracterizada primariamente como zoonose de animais silvestres, pode acometer o homem de forma acidental (LIMA, 2010).

Os hospedeiros vertebrados funcionam como reservatórios primários e secundários da doença. Os principais representantes silvestres são os marsupiais

(gambá), roedores (paca e rato) e edentados (tatu e tamanduá). Com o advento da urbanização animais domésticos como canídeos, ungulados e felinos passaram a ser envolvidos na cadeia epidemiológica, embora não apresentem papel fundamental no ciclo de transmissão (AEDO, 2007; COELHO, 2010).

2.4. Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

O ciclo tem início quando o inseto vetor ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. No intestino dos flebotomíneos, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas procíclicas (fase em que se multiplicam rapidamente por divisão binária simples), com posterior processo de diferenciação morfológica e funcional chamado de metaciclogênese, no qual o parasita passa da forma procíclica inicial a forma metacíclica infectante. As formas promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto onde permanecem até serem transmitidas a outro hospedeiro dando continuidade ao ciclo (AEDO, 2007; PEREIRA, 2012).

O hospedeiro adquire a doença, a partir da picada do inseto vetor infectado com formas promastigotas. Durante o repasto sanguíneo essas estruturas são inoculadas juntamente com a saliva e esta contém propriedades anestésicas, vasodilatadoras e imunossupressoras, além de contribuir para o papel modulador na resposta imunológica do hospedeiro (AEDO, 2007; SILVEIRA et al., 2008).

No hospedeiro invertebrado as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos (primeiras células recrutadas para o local dérmico da infecção por *Leishmania*), onde irá ocorrer a formação do fagossomo que se funde aos lisossomos formando o vacúolo digestivo, local onde o parasita sobrevive e estabelece condições favoráveis para sua diferenciação em amastigota, essa forma tem a capacidade de se desenvolver e multiplicar em meio ácido, lisando o macrófago e liberando as amastigotas que infectam outros macrófagos ou são ingeridas no momento do repasto sanguíneo por outros insetos vetores reiniciando o ciclo e propagando a infecção (Figura 3) [AEDO, 2007; PEREIRA, 2012; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012]

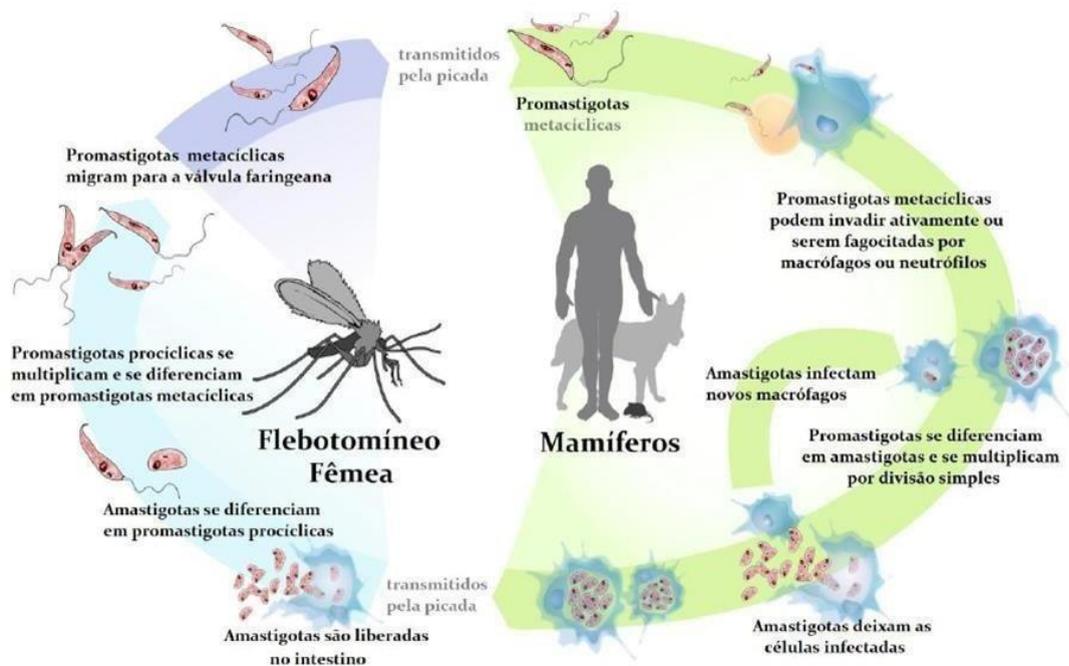


Figura 3. Ciclo de transmissão da Leishmaniose.
Fonte: Canalciencia.ibict.br.

2.5. Manifestações Clínicas da LTA

A LTA compreende um grupo de doenças cujas manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida, a relação parasita-hospedeiro determinada pelo estado imunológico do indivíduo afetado e o estado genético do mesmo, dessa forma ela se caracteriza desde infecções assintomáticas à apresentação de lesões nas formas cutâneas e mucosas (CORREA, 2007; COELHO, 2010).

A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação clínica mais frequente, definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, surgindo como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. O período de incubação é de duas semanas a dois meses até o surgimento da lesão ulcerada em áreas expostas da pele, geralmente indolor, atribuindo um formato arredondado ou ovalado, com bordas elevadas, bem delimitadas, fundo com tecido de granulações grosseiras caracterizando a lesão clássica com bordas em moldura (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Pode ser classificada segundo o Ministério da Saúde (2017) de acordo com as seguintes apresentações clínicas:

- I. **Forma cutânea localizada:** é caracterizada por lesões ulceradas, podendo ser única ou múltipla, com o aparecimento de lesões diretamente relacionadas a múltiplas picadas, possui boa resposta ao tratamento e tendência à cura (Figura 4A);

- II. **Forma cutânea disseminada:** é caracterizada por múltiplas lesões papulares de aparência acneiforme. Nestes pacientes, iniciam com uma ou varias lesões localizadas de característica clássica, posteriormente os parasitas são disseminados por via hematogênica ou linfática causando lesões distintas do local da picada. Apresenta resultados variáveis com o uso de antimoniais, tornando-se necessários tratamentos adicionais para alcançar a cura clínica (Figura 4B);

- III. **Forma cutânea difusa:** é a forma mais rara e grave da doença, ocorrendo em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular e em pacientes com anergia. Inicia de forma insidiosa com múltiplas lesões, evoluindo lentamente com formação de placas e nodulações não ulceradas em grandes extensões cutâneas, apresentando má resposta ao tratamento.

Outros tipos de lesões cutâneas podem ser encontrados durante a evolução da doença, sendo possível encontrar formas ectematóides, tipo pápula, impetigóides, verrucosa, em placa, nodular, vegetante e úlcera franca (GUIMARÃES et al., 2005; BRASIL, 2010; FIGUEIRA, 2013) [Figura 4].



Figura 4. Polimorfismo das lesões da Leishmaniose Cutânea. A) Lesão tipo pápula; B) Lesão em placa; C) Úlcera franca; D) Impetigoide; E) Ectimatoide; F) Nodular; G) Úlcero-vegetante; H) Lesão verrucosa.

Fonte: NAIFF JR et al. (2009)

A leishmaniose mucosa (LM) é caracterizada por lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores, indolor, podendo acometer o septo nasal, orofaringe, língua, palato, lábios, etc. Esses pacientes estão relacionados à LC de evolução crônica, curada com tratamento inadequado ou sem tratamento, em alguns casos ocorre por extensão da lesão cutânea ou com início da lesão na semimucosa exposta. É uma doença de difícil tratamento apresentando um prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura (BRASIL, 2017).

2.6. Epidemiologia da Leishmaniose

A leishmaniose é considerada uma doença endêmica notificada em 98 países distribuídos em quatro dos sete continentes com registro de 0.7 a 1.3 milhões de casos por ano, estando entre as seis doenças infecciosas mais importantes segundo a OMS (OMS, 2012).

No continente americano os casos são distribuídos desde o México à Argentina, sendo considerado um problema de saúde pública devido a sua ampla distribuição geográfica, magnitude e pelas formas clínicas serem invasivas podendo causar mutilações, incapacidades e levar a morte (PAHO/WHO, 2015).

No período de 2001 a 2013, 743.970 novos casos foram registrados com uma média anual de 57.228 casos. Observando esses índices no período entre 2010 e

2013 nota-se uma redução no número desses registros que podem ser atribuídas ao sistema de vigilância sanitária, a organização do serviço, dentre outros (PAHO/WHO, 2015).

No Brasil, a LTA é considerada uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, apresentando ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões. No período de 1995 a 2016 foram registrados uma média anual de 25.763 novos casos. Em 2016, foram registrados no Brasil 12.690 novos casos (Tabela 1), com destaque para a região norte (5.075 casos) e nordeste (3.166 casos) [BRASIL, 2017].

Tabela 1. Casos novos de LTA entre os anos de 2010 a 2016, nas regiões do Brasil.

Região	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Brasil	21.981	21.395	23.547	18.226	20.296	13.395	12.690
Região Norte	7.108	8.615	10.196	8.407	10.387	8.939	5.075
Região Nordeste	8.911	7.952	8.279	5.355	4.969	5.152	3.166
Região Sudeste	2.428	2.179	1.388	1.150	1.460	1.762	1.221
Região Sul	253	317	439	296	373	493	212
Região Centro-Oeste	3.163	2.274	3.118	2.292	3.038	2.937	1.974

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017.

Na região norte o Amazonas destacou-se como o terceiro estado com maior número de casos novos (828 casos), apresentando alta incidência de LTA devido à abertura de novas estradas, núcleos residenciais em locais de floresta tropical, treinamento militar, dentre outros fatores que levam o homem a adentrarem regiões de mata e entrarem em contato com o parasita. As espécies predominantes no estado são *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (PINHEIRO, 2008; BRASIL, 2017).

2.7. Tratamento da LTA

O tratamento da LTA no Brasil durante décadas é realizado conforme estabelecido pela OMS, no qual se limita ao uso de drogas de primeira escolha que

são representadas pelos antimoniais pentavalentes que acompanham historicamente a terapia da doença e as drogas de segunda escolha que são representados pelos não antimoniais, que são formas de tratamentos adotadas ao longo dos anos (CHRUSCIAK, 2009; BRASIL 2010; CDC, 2016).

2.7.1. Antimoniais pentavalentes (Sb⁵⁺)

Os antimoniais pentavalentes (Sb⁵⁺) durante décadas permaneceram como a terapia de primeira escolha para o tratamento da LTA com duas formulações disponíveis no mercado, Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®], Sanofi Aventis) comercializado no Brasil e nos países de língua francesa e espanhola, e o Estibogluconato de Sódio (Pentostan[®], Glaxo - Smith Kline) comercializado nos países de língua inglesa (BRASIL, 2010; FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012).

Atualmente no Brasil, a indicação da droga deve considerar a espécie de *Leishmania* infectante, dessa forma o Glucantime[®] é recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) para pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* e outras espécies, exceto *L. (V.) guyanensis* (BRASIL, 2017).

Este medicamento é encontrado em frascos de 5 mL, com 1,5 g do antimoniato bruto o que equivale a 405 mg de Sb⁵⁺, ou seja, a cada 1mL contém 81 mg de antimônio. Segundo o esquema terapêutico padronizado pela OMS é recomendado que a dose do antimônio seja calculada em mg/Sb⁵⁺/Kg/dia durante um período de 20 a 30 dias e aplicadas por vias intramuscular (IM) ou endovenosa (EV) [BRASIL, 2010; FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012].

Embora tenham bons resultados clínicos no tratamento da LTA o Glucantime[®] ainda apresenta eficácia limitada, desvantagens quanto ao tratamento longo, com administração parenteral diária e acompanhamento constante, toxicidade e efeitos adversos tais como artralgia, mialgia, cefaleia, febre, vômitos, náuseas, tonturas, pancreatite, toxicidade cardíaca e renal, dentre outros podendo chegar à morte súbita, além de serem contraindicados para gestantes por serem abortivos (CROFT, 2006; SILVA, 2012).

O mecanismo de ação dos antimonais pentavalentes não é totalmente elucidado, apesar de ser empregado há muitos anos no tratamento contra

leishmaniose. Uma das sugestões é que eles atuam inibindo a glicose e a oxidação de ácidos graxos de organelas localizadas nas formas amastigotas, consequentemente reduzindo a produção de ATP e GTP e dessa forma interferindo na bioenergética desses parasitas, que quando expostos a 500 mg Sb^{5+} /mL facilita a destruição do parasita; outro modelo sugere que eles exercem pouco efeito sobre formas promastigotas, supondo que é necessário que ocorra redução do antimônio pentavalente (Sb^{5+}) para antimônio trivalente (Sb^{3+}) em meio biológico através dos tióis para que ocorra a atividade leishmanicida (FRÉZARD, 2005; SINGH et al., 2016).

2.7.2. Isetionato de Pentamidina (Pentacarinat[®])

O isetionato de pentamidina é uma diamina aromática utilizada contra um grande número de patógenos, sendo que a dose recomendada para as diferentes manifestações clínicas é de 4 mg/Kg/dia, com intervalo de dois em dois dias, sem ultrapassar a dose total de 2 g e a aplicação é por via intramuscular e endovenosa (BRASIL, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010).

Os efeitos colaterais mais frequentes na utilização do isetionato de pentamidina são vômitos, tontura, mialgia, cefaleia, hipoglicemia e hiperglicemia entre outros, por ter um método de aplicação invasivo pode ocasionar dor, endurecimento e abscessos estéreis no local da aplicação (GOTO, 2010).

O mecanismo de ação também não é totalmente esclarecido, mas demonstra uma relação com a inibição da RNA polimerase, na síntese de proteínas, de fosfolípidios e da função ribossomal (FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012).

2.7.3. Anfotericina B (Abelcet[®])

A anfotericina B é um antibiótico poliênico de reconhecida ação contra leishmaniose, comercializados em frascos de 50 mg, para ser administrada de forma gradativa partindo de uma dose inicial de 0,5 mg/Kg/dia conforme a tolerância do paciente até uma dose máxima de 1 mg/Kg/dia. A aplicação deve ser feita em dias alternados por meio endovenoso respeitando o limite máximo por aplicação de 50

mg até completar a dose total para LC de 1 a 1,5 g e para LM de 2,5 a 3 g (MARZOCHI, 2010, SINGH et al., 2016).

Os efeitos colaterais mais comuns incluem vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. A cardio e nefrotoxicidade, além do uso EV, impedem seu uso fora do ambiente hospitalar (BRASIL, 2010; SINGH et al., 2016).

Atua tanto em formas promastigotas como em amastigotas, apresentando toxicidade seletiva por interferir nos ésteres da membrana citoplasmática (FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012).

2.7.4. Pentoxifilina

A pentoxifilina é um medicamento da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas indicado pela OMS e a Organização Pan-Americana como adjuvante associado ao antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose tegumentar, não tendo indicação como um medicamento isolado. É comercializado como comprimido revestido de liberação prolongada de 400 mg para ser administrado de forma oral com a dose usual de um comprimido duas ou três vezes ao dia, ingerido inteiro, após as refeições (BULA PENTOXIFILINA, 2013; BRASIL, 2017).

Os efeitos colaterais mais comuns são *flush* (rubor facial com sensação de calor) e distúrbios gastrointestinais, como sensação de pressão gástrica, plenitude, náusea, vômito ou diarreia. É contra indicado para crianças menores de 12 anos e gestantes (BULA PENTOXIFILINA, 2013; BRASIL, 2017).

Atualmente, o tratamento da Leishmaniose no Brasil segue a recomendação da OMS para a realidade das Américas, sendo assim para definir a terapêutica a ser adotada devem-se considerar as características clínicas das lesões, a susceptibilidade aos medicamentos, a localização geográfica em que a infecção foi adquirida e a espécie de *Leishmania* infectante, conforme o protocolo descrito no quadro 1.

Quadro 1. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar de acordo com a forma clínica e espécie de *Leishmania* infectante.

Protocolo Terapêutico	
Forma Clínica/Espécie	Terapêutica
<p>Cutânea Localizada <i>Leishmania</i> spp. exceto <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i></p>	<p>Primeira Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina (EV ou IM); • Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desoxicolato de anfotericina B; • Isetionato de Pentamidina.
<p>Cutânea Localizada <i>L. (V.) guyanensis</i></p>	<p>Primeira Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isetionato de Pentamidina; • Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina; • Desoxicolato de anfotericina B.
<p>Cutânea Disseminada <i>Leishmania</i> spp.</p>	<p>Primeira Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina (EV ou IM); • Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desoxicolato de anfotericina B.
<p>Cutânea Difusa <i>Leishmania</i> spp.</p>	<p>Primeira Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isetionato de Pentamidina. <p>Segunda Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina; • Desoxicolato de anfotericina B; • Anfotericina B lipossomal.
<p>Mucosa <i>Leishmania</i> spp.</p>	<p>Primeira Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina (EV ou IM) associado à pentoxifilina; • Antimoniato de meglumina (EV ou IM); • Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda Escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desoxicolato de anfotericina B; • Isetionato de Pentamidina.

Fonte: MS, 2017.

EV: endovenoso

IM: intramuscular

2.8. Utilização de produtos naturais (PN) na indústria farmacêutica

Desde os primórdios, o homem retira das fontes naturais recursos para tratar doenças e aliviar dores, de forma que os recursos terapêuticos eram retirados das plantas, animais e minerais. O uso de plantas para fins medicinais foi difundido inicialmente pelos egípcios, indianos e chineses há mais de 8.000 anos (NASCIUTTI, 2012).

A civilização egípcia foi marcada por suas técnicas medicinais de conservação de múmias considerado ainda um desafio para a medicina moderna, na China por sua vez a medicina tradicional desenvolveu-se com tanta eficiência que até hoje os preparados vegetais são estudados almejando o desenvolvimento do mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos. Dessa forma a utilização de recursos naturais foi então se espalhando para outras regiões do mundo como a civilização greco-romana que descobriu os venenos a partir da natureza, que utilizavam para sua própria defesa, para caçar e até mesmo para meios ilícitos como o conhecido caso da morte de Sócrates com o veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) (BOLZANI; JUNIOR, 2006; NASCIUTTI, 2012).

Os farmacêuticos a partir de Galeno (129-199 D.C) começaram a investigar e utilizar a forma pura de medicamentos naturais. Friedrich Serturmer em 1806 foi o primeiro a isolar o alcaloide da morfina da papoula (*Papaver somniferum* L.) o que marcou a busca por outros medicamentos a partir de plantas, levando a descoberta de outros compostos farmacologicamente ativos (CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

A descoberta da salicina (analgésico e antitérmico) em 1829 foi o marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica a partir da planta *Salix alba* L.. Devido ao seu caráter ácido a salicina atacava o estômago causando desconforto às pessoas que faziam uso, diante dessa situação, variações dessa molécula foram obtidas e testadas realizando a primeira modificação estrutural da história que deu origem em 1839 ao ácido salicílico, que apesar de se mostrar eficiente ainda possuía o caráter fortemente ácido. Felix Hoffman em 1897 a partir do ácido salicílico sintetizou a aspirina (ácido acetil salicílico) e dessa forma obteve a primeira patente que se tem conhecimento na área de medicamentos (BOLZANI; JUNIOR, 2006; BARREIRO, 2009).

Com o desenvolvimento da química orgânica teórica e experimental, outras substâncias com propriedades terapêuticas são sintetizadas em laboratório. Atualmente os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico (MENEGATTI et al., 2001; BARREIRO, 2009).

Em uma revisão de fármacos introduzidos no mercado entre 1981 e 2014 os PNs tem desempenhado um grande papel na descoberta de novos fármacos ao longo de mais de 30 anos, visto que 30% eram PN ou seus derivados, 14% eram sintetizados de origem natural e 5% antiparasitários, dentre esses apenas 16 medicamentos foram introduzidos no mercado, sendo principalmente advindos de produtos naturais e seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

2.8.1. Terpenos

Os terpenos constituem um conjunto de metabólitos secundários quimicamente diversos, assim chamados porque os primeiros membros da classe foram isolados da terebentina e representam o grupo mais difundido de produtos naturais com aproximadamente 30.000 compostos terpênicos caracterizados (MEWALAL et al., 2016).

Esses compostos são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas (C_5H_8) que atuam como um esqueleto de carbono para esses terpenóides originando os monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e os tetraterpenos (MUFFLER et al., 2011).

Os terpenos são sintetizados pela via do mevalonato no citoplasma no qual inicia com a condensação da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA, que por hidrólise forma o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), esse é reduzido por um processo dependente de NADPH sendo catalizado por uma HMG-CoA redutase formando o mevalonato, por sua vez este é convertido a isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (SIMÕES et al. 2007).

A síntese também pode ocorrer pela via DXPS (1-deoxe-D-xilulose) que irá formar o isopentenil-pirofosfato a partir da condensação do piruvato com D-gliceraldeído-3-fosfato que forma a 1-deosi-D-xilulose-5-fosfato. Após reações

suscessivas são formadas as moléculas de IPP e DEMAPP. A formação dessas moléculas por ambas as vias após um processo de condensação formam o transgeranilpirofosfato (GPP) que origina os diferentes monoterpenos, essa cadeia condensada com outra unidade de IPP, formam as cadeias crescentes de 5 em cinco carbonos originando os sesquiterpenos, diterpenos e assim por diante (DEWIK, 2002). Os terpenos mais encontrados em óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos (MEWALAL et al., 2016).

2.9. Considerações gerais sobre zerumbona

2.9.1. *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.

A *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm. é uma planta popularmente conhecida como gengibre selvagem e gengibre asiático, pertencente a família Zingiberaceae, que é considerada uma das maiores famílias do reino vegetal com aproximadamente 53 gêneros e 1.200 espécies economicamente importante nos trópicos, distribuídas principalmente em áreas tropicais e subtropicais com destaque para a região do Sudeste Asiático (KADER et al., 2011; KOGA; BELTRAME; PEREIRA, 2016).

Tem sido utilizada por milhares de anos como temperos e para fins medicinais. Embora seja uma planta conhecida da Índia e da Península da Malásia não deixa de ser distribuída em muitos outros países como, por exemplo, Indonésia, China, Bangladesh, Vietnã, Japão, Birmânia, Nepal, Brasil, Jamaica, Nigéria, dentre outros (FADZIL, 2013; RAHMAM et al., 2014). No Brasil, encontra-se principalmente no Amazonas, em regiões do Tarumã e Puraquequara, que são áreas rurais da cidade de Manaus (KOGA; BELTRAME; PEREIRA, 2016).

A planta pode crescer até 2,1 m de altura, é tuberosa, perene e dispersa em partes úmidas e sombreada de terras baixas ou encostas de montanhas e frequentemente encontrada perto de rios e cachoeiras. As folhas são estreitas e longas dispostas ao longo da haste com aproximadamente 25 a 35 cm de comprimento. Os rizomas apresentam cor amarela e o cheiro pungente e as flores são suportadas em um pseudotalo separado das folhas em formato de pico, que se

apresentam verde quando jovens e vermelhas quando mais velhas (Figura 5) [KADER et al., 2011; RAHMAN et al., 2014; KOGA; BELTRAME; PEREIRA,2016].



Figura 5. *Zingiber zerumbet* (A), rizomas (B) e flores (C).
Fonte: FADZIL (2013).

A parte de interesse desta planta são os rizomas que são utilizados na medicina popular para o tratamento de náuseas, asma, enjoo, diarreia, cólicas, sinusite, inflamações, infecções bacterianas, alergia e outros. Atualmente, o extrato feito a partir do rizoma tem sido estudado por conta da sua eficácia numa gama de atividades incluindo antimicrobiana, analgésica, antialérgico, anticoagulante dentre outras (RAHMAM, 2014; IGARASHI, 2016).

2.9.2. Zerumbona

Zerumbona (Figura 6) é um composto bioativo (CAS: 471-05-6) encontrado principalmente em *Zingiber zerumbet* (Zingiberaceae), sendo considerado o sesquiterpeno principal dos rizomas e óleos essenciais desta planta. Ela foi isolada pela primeira vez a partir de óleo essencial de rizomas em 1956, enquanto que a sua estrutura química foi determinada em 1960, e posteriormente caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectroscopia de Raio-X (KITAYAMA et al., 2001).

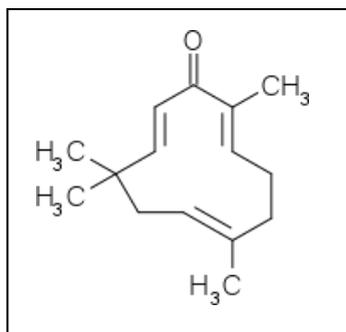


Figura 6. Estrutura química da zerumbona.
Fonte: CHAGAS, 2018. BKchem.

Ao longo dos anos várias propriedades foram atribuídas a este composto, desde a supressão da proliferação do câncer de mama além de induzir a apoptose em células de linhagem de outros tipos de câncer (antitumoral) com efeitos mínimos sobre células normais, diminuição significativa de biomarcadores inflamatórios (anti-inflamatória), inibição da ativação do éster induzido pelo vírus Epstein-barr (antiviral), até efeito sobre a progressão do ciclo celular (imunomodulador) além de atividade antioxidante, antialérgica, antidiabética, antimicrobiana entre outras (TAKADA, MURAKAMI, AGGARWAL, 2005; RAHMAN et al., 2014).

Estudos recentes foram desenvolvidos para avaliar se a zerumbona possui atividade antileishmania contra *Leishmania L. donovani*. Segundo MUKHERJEE (2015), a zerumbona apresentou atividade contra formas promastigotas e inibiu amastigotas intracelulares. Em 2014, SINGH demonstrou que o óleo dos rizomas apresentou atividade moderada, enquanto a substância isolada demonstrou boa atividade com IC₅₀ e IC₉₀ de μg 1,6 g/mL e 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Por possuir diversas propriedades biomédicas, há um grande interesse em realizar estudos com a zerumbona para o tratamento de LTA, uma vez que não se tem descrito na literatura estudo desse composto para o tratamento dessa enfermidade (NAKAMURA et al., 2004; TZENG et al., 2014; CHIA et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* da zerumbona em *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade da zerumbona contra as formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* da zerumbona em macrófagos peritoneais murinos de cultivo primário;
- Avaliar a atividade da zerumbona contra formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, COSAS (Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco, onde foram desenvolvidos os bioensaios *in vitro*.

4.1. Substâncias utilizadas no estudo

Substância e concentrações utilizadas neste estudo estão descritas a seguir:

- I. Zerumbona Sigma - Aldrich™
(0.015 - 0.250 mg/mL)
- II. Antimoniato de Meglumina
(Glucantime®)(0.5 - 4 mg/mL)
- III. Dimetilsulfóxido
(DMSO).(0.125 - 2%)

A zerumbona foi diluída em DMSO a 2% e meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co, USA) completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado / SFBi) passada em filtro de membrana com poros de 0,22 µm, em condições estéreis, para a obtenção da solução na concentração de 1 mg/mL.

4.2. Atividade *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Leishmania* (V.) *guyanensis*

4.2.1. Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária

Foram utilizadas formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) e *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), mantidas e criopreservadas no criobanco de cepas de leishmanias do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, COSAS, INPA. Os parasitas foram cultivados

em meio RPMI 1640 completo e incubados a 25 °C para obtenção de massa parasitária, posteriormente foram utilizados para os bioensaios e criopreservação (SOARES, 2017).

4.2.2. Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*

Para avaliar o crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, a massa parasitária obtida no cultivo das espécies foram centrifugadas a 4.400 rpm/15 minutos, a fim de descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. Em seguida foi retirada uma alíquota de 10 µL, quantificado em câmara de Neubauer e ajustada para obtenção da concentração parasitária de 2×10^6 promastigotas/mL e semeadas em triplicata em meio de cultura RPMI completo incubados em estufa a 25 °C.

A cada 24 horas alíquotas da cultura foram retiradas e quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x, até a verificação da morte parasitária de acordo com Junior (2013).

Média aritmética das contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas em um mL da cultura. O cálculo foi feito utilizando a fórmula: n° de parasitas = média dos quatro quadrantes maiores x inverso da diluição da amostra x 10^4 .

4.2.3. Bioensaio para determinação da atividade antileishmania e da concentração efetiva de 50% (CE₅₀) da zerumbona

A atividade antileishmania da zerumbona foi avaliada pela viabilidade e inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

Como controle negativo foram utilizados DMSO e meio RPMI 1640 acrescido de parasita e como controle positivo antimoniato de meglumina (Glucantime®). Para a realização do bioensaio, a zerumbona foi adicionada em triplicata e diluída em série (1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64) em meio RPMI 1640 completo contido em placa de 96 poços em um volume final de 100 µL/poço.

A cultura de formas promastigotas foi centrifugada a 4.400 rpm /15 minutos, e diluídas em RPMI 1640 completo, quantificadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para obter a concentração parasitária de 2×10^6 parasitas/mL, também em um volume final de 100 μ L/poço de acordo com Fumarola; Spinelli, Brandonisio (2004). Posteriormente, esta concentração de promastigotas foi adicionada aos poços contendo as drogas diluídas, totalizando um volume final de 200 μ L por poço. A placa do bioensaio foi incubada em estufa a 25 °C durante 24 - 96 horas para a espécie de *L. (L.) amazonensis* e de 24 - 72 horas para a espécie de *L. (V.) guyanensis*.

Para avaliar a viabilidade celular foi empregado o método de contagem de células viáveis utilizando o corante Azul de Tripán (Sigma, USA) e avaliando a motilidade celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico em 400x (SOARES, 2017).

4.3. Ensaio de citotoxicidade e atividade *in vitro* contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*

4.3.1. Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Para obtenção dos macrófagos peritoneais murinos, houve a necessidade de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA - INPA), no que diz respeito aos aspectos de natureza ética em experimentação animal, sendo aprovado sob o n° 014/2015.

Camundongos (*Mus musculus*) BALB/c foram eutanasiados a fim de expor a cavidade abdominal para realização da coleta, e em seguida na cavidade peritoneal foram injetados 5 mL de RPMI 1640 estéril, posteriormente o animal foi submetido a uma massagem abdominal e em seguida retirado o RPMI 1640 com auxílio da seringa contendo os macrófagos. As células foram centrifugadas a 4.400 rpm/10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 1 mL de RPMI 1640 com 10% de SFBi e então separado para os ensaios de citotoxicidade e amastigota (GORDON et al., 1974).

4.3.2. Atividade citotóxica em macrófagos peritoneais murinos

Para avaliação da citotoxicidade, os macrófagos peritoneais murinos foram quantificados em câmara de Neubauer e ajustados para 10^4 células/mL e em seguida foram incubados em placa de 96 poços em meio RPMI sem indicador de pH / vermelho fenol (Sigma Chemical Co, USA) completo a 37 °C em estufa.

As culturas ficaram expostas as substâncias durante um período de 48 a 96 horas e incubadas a 37 °C. Após os períodos de incubação, foram adicionados aos poços 10 µL da solução de Alamar Blue® de acordo com protocolo descrito pelo fabricante, e então as placas foram novamente incubadas por 12 horas a 37 °C, após esse período submetido à leitura em espectrofotômetro (Bio-tek®) com um comprimento de onda de 590 nm.

As células foram tratadas com zerumbona e para o controle foi utilizado células não tratadas, células tratadas com Glucantime® e células tratadas com DMSO. As substâncias foram testadas nas concentrações determinadas anteriormente.

4.3.3. Ensaio morfológico de citotoxicidade da zerumbona sobre macrófagos peritoneais murinos

Para avaliação da atividade citotóxica morfológica, os macrófagos peritoneais murinos foram quantificados em câmara de Neubauer e ajustados para 10^4 células/mL e em seguida foram incubados em placa de 24 poços (em triplicata) frente à zerumbona, Glucantime® e DMSO nas concentrações pré-estabelecidas, em meio RPMI completo, mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, a fim de que fosse avaliada a morfologia dos macrófagos frente as substâncias em teste no período de 48 a 96 horas.

4.3.4. Verificação da viabilidade de formas amastigotas em macrófagos peritoneais murinos após exposição a zerumbona

Para verificação da viabilidade de formas amastigotas intracelulares, os macrófagos peritoneais murinos foram incubados em placas de cultivo de 24 poços,

cada poço contendo uma lamínula de vidro estéril. Cada poço recebeu 100 µL de RPMI 1640 completo, contendo uma concentração de 10^4 macrófagos/mL os quais foram mantidos a temperatura de 37 °C em estufa por 48 horas para que ocorresse a aderência dos macrófagos a lamínula.

Após o período de incubação, foram realizadas lavagens com meio RPMI 1640, a fim de retirar todas as células que não aderiram à lamínula, e então os macrófagos foram submetidos à infecção por promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* em fase estacionária de crescimento, ajustadas para uma concentração 10^5 células/mL, a ser incubada por poço. Os parasitas foram adicionados, nesta concentração, em um volume de 100 µL/poço. As placas novamente foram incubadas durante 2h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ para que ocorresse a infecção. Após esse período foram feitas de 3 a 4 lavagens dos poços com meio RPMI 1640 completo, para remover as promastigotas não fagocitadas e células não aderidas.

A zerumbona foi adicionada sobre as lamínulas com macrófagos infectados em um volume final de 100 µL/poço. Como controles positivos foram utilizados células não infectadas (não tratadas) e células infectadas tratadas com Glucantime® e como controles negativos foram utilizadas células infectadas com os parasitas (sem tratamento) e células infectadas tratadas com DMSO. As substâncias foram testadas nas concentrações determinadas anteriormente.

As placas foram novamente incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 e 72 horas para a espécie de *L. (V.) guyanensis* e 72 h e 96 horas para a espécie de *L. (L.) amazonensis*. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas dos poços e coradas por Panótico Rápido (Laborclin®) e montadas em lâminas permanentes com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec®, USA).

A resposta dos macrófagos e amastigotas intracelulares aos tratamentos foi avaliada por observação das lamínulas impregnadas com macrófagos sob microscópio óptico em 1000x. A análise foi feita através da quantificação de 100 células/lamínula, especificando o número de macrófagos infectados, de amastigotas intracelulares e macrófagos não infectados. Desta forma, foram estabelecidas as taxas de infecção dos macrófagos em cada lamínula, e por fim, obteve a média da taxa de infecção entre as triplicatas. As médias dos percentuais de infecção de macrófagos, estabelecidas na presença de cada droga, foram comparadas com a

taxa de infecção média do controle negativo (macrófagos infectados e não tratados) [SOARES, 2017].

4.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6 e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de cada grupo de tratamento e controles. As análises foram realizadas por ANOVA seguida do teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*

A curva de crescimento estabelecida para os parasitas de *L. (L.) amazonensis* apresentou as seguintes fases de proliferação celular: fase exponencial entre 24 - 72 horas, seguido da fase estacionária que ocorre entre 72 - 96 horas e o período de declínio que inicia a partir de 96 horas (Figura 7A).

A curva de crescimento estabelecida para os parasitas de *L. (V.) guyanensis* apresentou a seguintes fases de proliferação celular: fase exponencial entre 24 - 120 horas, seguido da fase estacionária que ocorre entre 120 - 144 horas e o período de declínio que inicia a partir de 144 horas (Figura 7B).

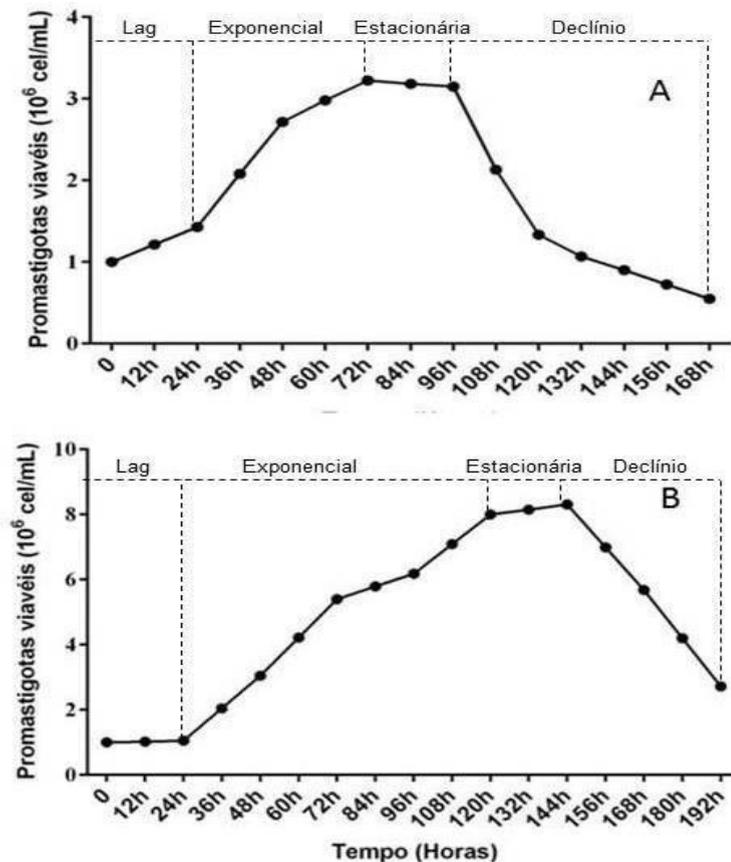


Figura 7. Curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IMHOM/BR/2009/IM5584) (A) e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) (B). Os valores expressam a média de três determinações e estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

Em todos os experimentos com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, optou-se por utilizar os parasitas no 4º dia do crescimento e com *L. (V.) guyanensis* optou-se por utilizar parasita entre o 5º e 6º dia de crescimento, todos na 4º passagem em cultivo.

5.2. Avaliação da atividade da zerumbona contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A avaliação da atividade da zerumbona foi determinada pela viabilidade de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* expressos pela Concentração Efetiva (CE₅₀) que corresponde à concentração capaz de provocar a redução de 50% do crescimento dos parasitas.

A Tabela 2 apresenta os valores calculados para o CE₅₀ em que é possível observar uma atividade promissora da zerumbona, sendo considerada ativa para *L. (L.) amazonensis* no período de 48 h a 96 h quando comparada ao Glucantime®.

Tabela 2. Valores de CE₅₀ (mg ± Desvio Padrão) da zerumbona após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Amostras	Valores CE ₅₀ /Período de incubação			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Glucantime®	7.22 ± 0.12	6.62 ± 0.22	*	0.44 ± 0.33
Zerumbona	12.02 ± 0.13	*	*	*

* = acima do valor máximo testado.

A viabilidade parasitária foi avaliada na presença da zerumbona e comparada com a maior concentração testada do Glucantime® e DMSO, e como controle negativo foram utilizados parasitas nas formas promastigotas na presença de meio de cultivo RPMI completo (Figura 8).

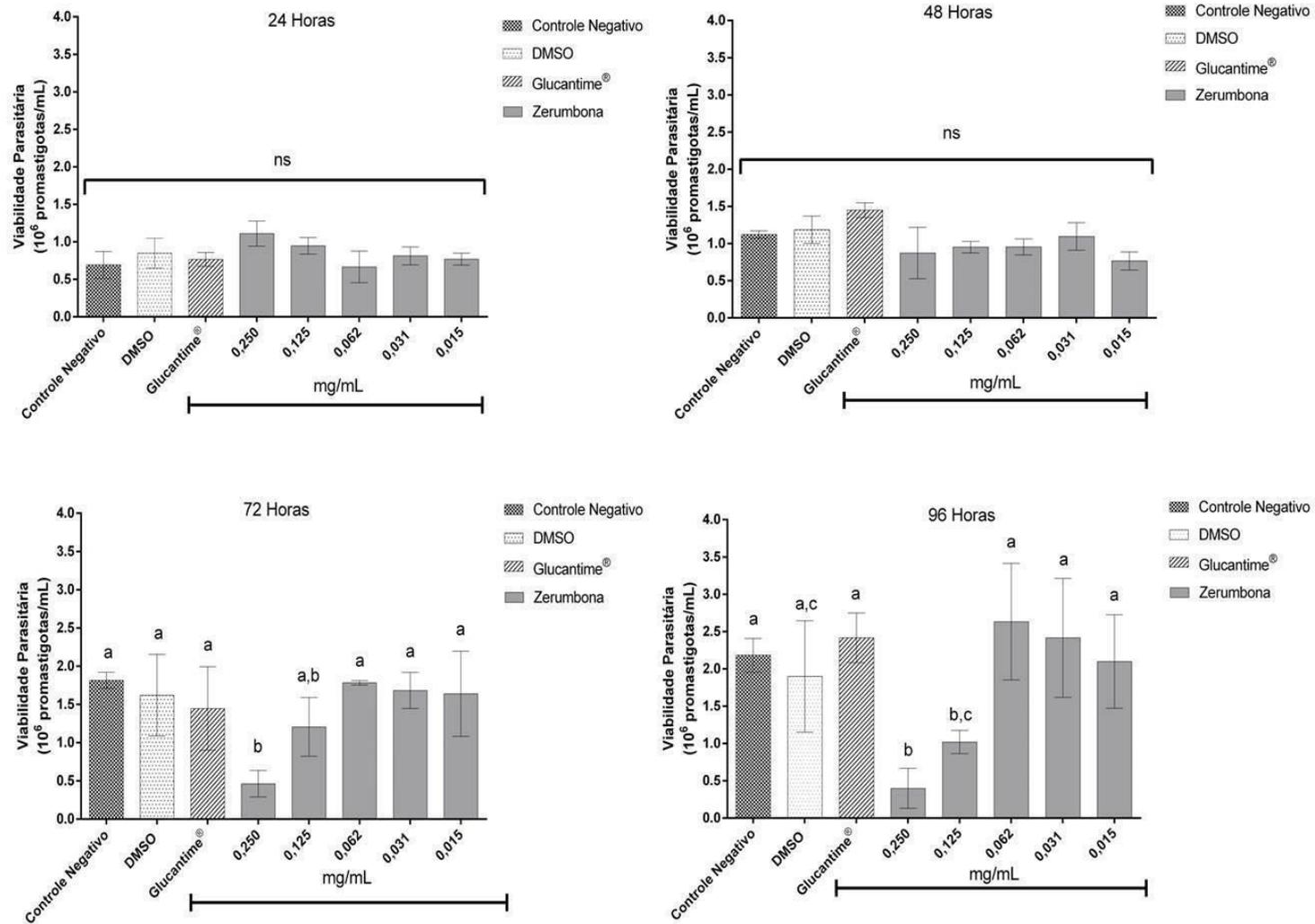


Figura 8. Atividade da zerumbona (0.250 - 0.015 mg/mL) frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no período de 24, 48, 72 e 96 horas em comparação aos controles: DMSO (2%), Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo. Letras diferentes representam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Observa-se na figura 8, que quando avaliada a atividade das concentrações testadas da zerumbona em relação ao tempo de incubação, foi observado que em 24 e 48 horas não houve diferença estatística entre os tratamentos, embora seja possível observar redução da viabilidade parasitária quando tratados com zerumbona na concentração de 0.250 mg/mL e crescimento parasitário no controle negativo, DMSO e Glucantime® no decorrer dos períodos descritos.

Quando avaliado os efeitos da zerumbona sobre a proliferação de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* é possível observar que em 72 horas a concentração de 0.250 mg/mL apresentou menor viabilidade parasitária e diferença estatística quando comparada ao controle negativo, DMSO, Glucantime® e demais concentrações testadas, com exceção da concentração de 0.125 mg/mL.

Quando avaliados os resultados da zerumbona no período de 96 horas, é possível observar que a menor viabilidade parasitária ocorre na concentração de 0.250 mg/mL. Tanto 0.250 mg/mL quanto 0.125 mg/mL apresentam diferença estatística quando comparadas ao controle negativo, Glucantime® e demais concentrações testadas, com exceção do DMSO para a concentração de 0.125 mg/mL.

Durante o período de incubação da espécie *L. (L.) amazonensis* na presença da zerumbona, foi observado que a partir do tempo de exposição de 48 horas na concentração de 0.250 mg/mL os parasitas se apresentavam lentos quando comparados ao grupo controle e na medida que o tratamento se prolongava essa característica se tornava mais evidente, podendo ser observado restos parasitários.

Considerando todos os períodos testados, sugere-se que as concentrações 0.250 mg/mL e 0.125 mg/mL apresentaram resultados promissores com tratamento a longo prazo como demonstrado no período de 72 e 96 horas.

5.3. Avaliação da atividade da zerumbona contra formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

A avaliação da atividade da zerumbona foi determinada pela viabilidade de formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* expressos na tabela 3, a qual apresenta os valores calculados para o CE₅₀ em que se observa uma atividade promissora da zerumbona, sendo considerada ativa em todo período de incubação quando comparada ao Glucantime®.

Tabela 3. Valores de CE₅₀ (mg ± Desvio Padrão) da zerumbona após 24, 48 e 72 horas de incubação com promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Amostras	Valores CE ₅₀ /Período de incubação		
	24 horas	48 horas	72 horas
Glucantime®	0,26 ± 1,12	1,25 ± 0,19	*
Zerumbona	*	*	*

* = acima do valor máximo testado.

A viabilidade parasitária foi avaliada na presença da zerumbona e comparada as maiores concentrações do Glucantime® e DMSO, e como controle negativo foram utilizados parasitas nas formas promastigotas na presença de meio de cultivo RPMI suplementado com SFBi (Figura 9).

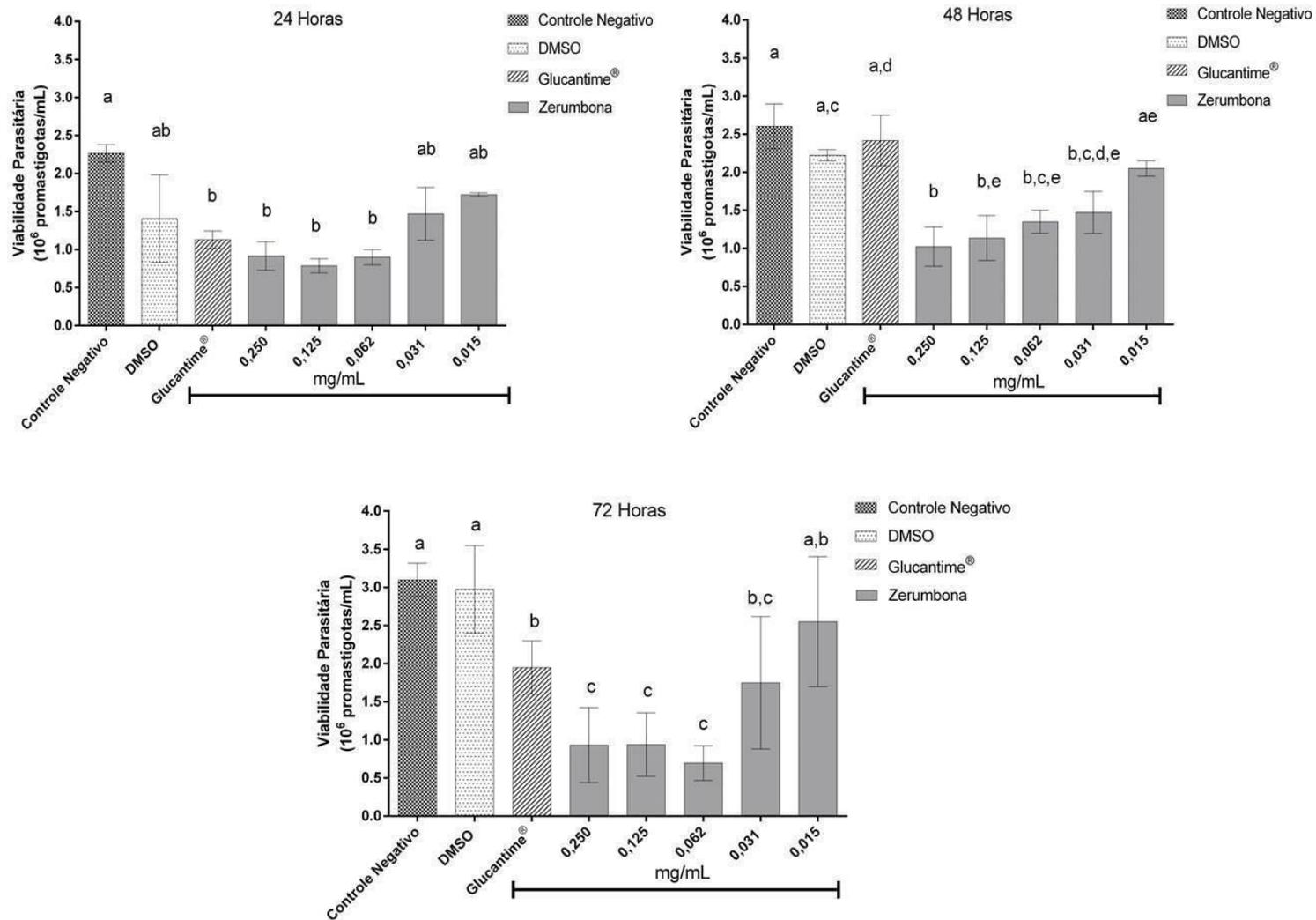


Figura 9. Atividade da zerumbona (0.2500.015 mg/mL) frente às formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* no período de 24, 48 e 72 horas em comparação aos controles: DMSO (2%), Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo. Letras diferentes apresentam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Observa-se na figura 9 que quando avaliada a atividade da zerumbona no período de 24 horas, é possível observar que não há diferença significativa entre as concentrações testadas quando comparadas ao Glucantime® e DMSO, embora seja possível observar que a viabilidade parasitária das três primeiras concentrações de zerumbona (0.250 - 0.062 mg/mL) sejam inferiores ao observado com Glucantime®. Quando comparados os tratamentos em relação ao controle negativo observamos diferença estatística com o Glucantime® e as concentrações de 0.250 - 0.062 mg/mL.

Quando avaliado os efeitos da zerumbona sobre a proliferação de formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* é possível observar que no tempo de exposição de 48 horas as concentrações de 0.250 - 0.062 mg/mL mesmo demonstrando aumento da viabilidade parasitária, apresentaram diferença estatística quando comparada ao controle negativo, DMSO e Glucantime®, com exceção da concentração de 0,062 mg/mL em relação ao DMSO.

Quando avaliados os resultados da zerumbona no período de 72 horas, é possível observar que a concentração de 0.250 - 0,062 mg/mL apresentaram diferença estatística e redução da viabilidade parasitária quando comparada ao controle negativo, DMSO e Glucantime®.

Assim como na espécie descrita anteriormente, foi observado que durante o período de incubação da espécie *L. (V.) guyanensis* na presença da zerumbona, os parasitas se apresentavam lentos quando comparados ao grupo controle, a partir de 48 horas na concentração de 0.250 mg/mL.

Considerando todos os períodos testados, sugere-se que as concentrações 0.250 - 0.062 mg/mL apresentaram resultados promissores com tratamento a longo prazo como demonstrado no período de 48 e 72 horas.

5.4. Ensaio de citotoxicidade da zerumbona pelo método colorimétrico de Alamar Blue® em macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos peritoneais murinos foram utilizados para determinar a citotoxicidade da zerumbona pelo método de Alamar Blue® utilizando o Glucantime® como controle positivo e como controle negativo DMSO e célula sem tratamento.

As respostas dos macrófagos frente às diferentes concentrações testadas estão apresentadas em porcentagem de viabilidade \pm DP na tabela 4.

Tabela 4. Efeito citotóxico da zerumbona em macrófagos peritoneais murinos por 48, 72 e 96 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica (Alamar Blue®).

Substâncias	Concentrações	% viabilidade \pm DP		
		48 Horas	72 Horas	96 Horas
Zerumbona (mg)	0.250	22.6 \pm 0.029	6.5 \pm 0.0106	7.89 \pm 0.005
	0.125	21.7 \pm 0.002	10.25 \pm 0.0007	8.97 \pm 0.003
	0.062	26.4 \pm 0.002	86.18 \pm 0.1025	74.76 \pm 0.019
	0.031	100 \pm 0.072	77.41 \pm 0.0282	100 \pm 0.044
	0.015	46 \pm 0.083	84.99 \pm 0.0091	100 \pm 0.242
Glucantime® (mg)	4.00	99.3 \pm 0.028	69.24 \pm 0.084	99.40 \pm 0.138
	2.00	97.3 \pm 0.267	85.28 \pm 0.054	96.88 \pm 0.019
	1.00	99.5 \pm 0.056	100 \pm 0.082	100 \pm 0.115
	0.50	89.7 \pm 0.154	100 \pm 0.294	100 \pm 0.034
	0.25	68 \pm 0.069	100 \pm 0.176	100 \pm 0.016
DMSO (%)	2.00	100 \pm 0.0007	76.52 \pm 0.046	100 \pm 0.082
	1.00	100 \pm 0.0268	100 \pm 0.016	100 \pm 0.019
	0.50	100 \pm 0.0049	79.34 \pm 0.057	94.01 \pm 0.064
	0.25	100 \pm 0.0000	82.61 \pm 0.045	98.32 \pm 0.082
	0.12	100 \pm 0.0028	85.79 \pm 0.019	94.7 \pm 0.007

Observa-se que a zerumbona mostrou-se tóxica nas concentrações 0.250 e 0.125 mg/mL com redução da viabilidade celular no decorrer do período de incubação. Em 48 horas a viabilidade celular nas concentrações 0.250 e 0.125 mg/mL foram de 22.6% e 21.7% respectivamente, entretanto nas mesmas concentrações no período de 72 horas a viabilidade celular foi de 6.5% e 10.5% e em 96 horas foi de 7.89% e 8.97%.

A medida que diminui a concentração de zerumbona a viabilidade celular aumenta, isso é observado em todo o período de incubação como por exemplo na concentração 0.015 mg/mL em 48 horas com 46% de viabilidade celular, a

concentração 0.062 mg/mL em 72 horas com 86.18% e a concentração 0.031 mg/mL com 100% em 96 horas.

O Glucantime® e DMSO não apresentaram citotoxicidade considerável e manteve a viabilidade celular durante todo o período de incubação.

5.5. Avaliação da morfologia de macrófagos peritoneais murinos tratados com zerumbona

Macrófagos peritoneais murinos (BALB/c, *Mus musculus*) tratados com a zerumbona foram avaliados quanto a morfologia no período de incubação de 48 a 96 horas e comparados com os controles Glucantime®, DMSO e célula sem tratamento, com objetivo de avaliar alterações morfológicas entre os grupos (Figura 10).

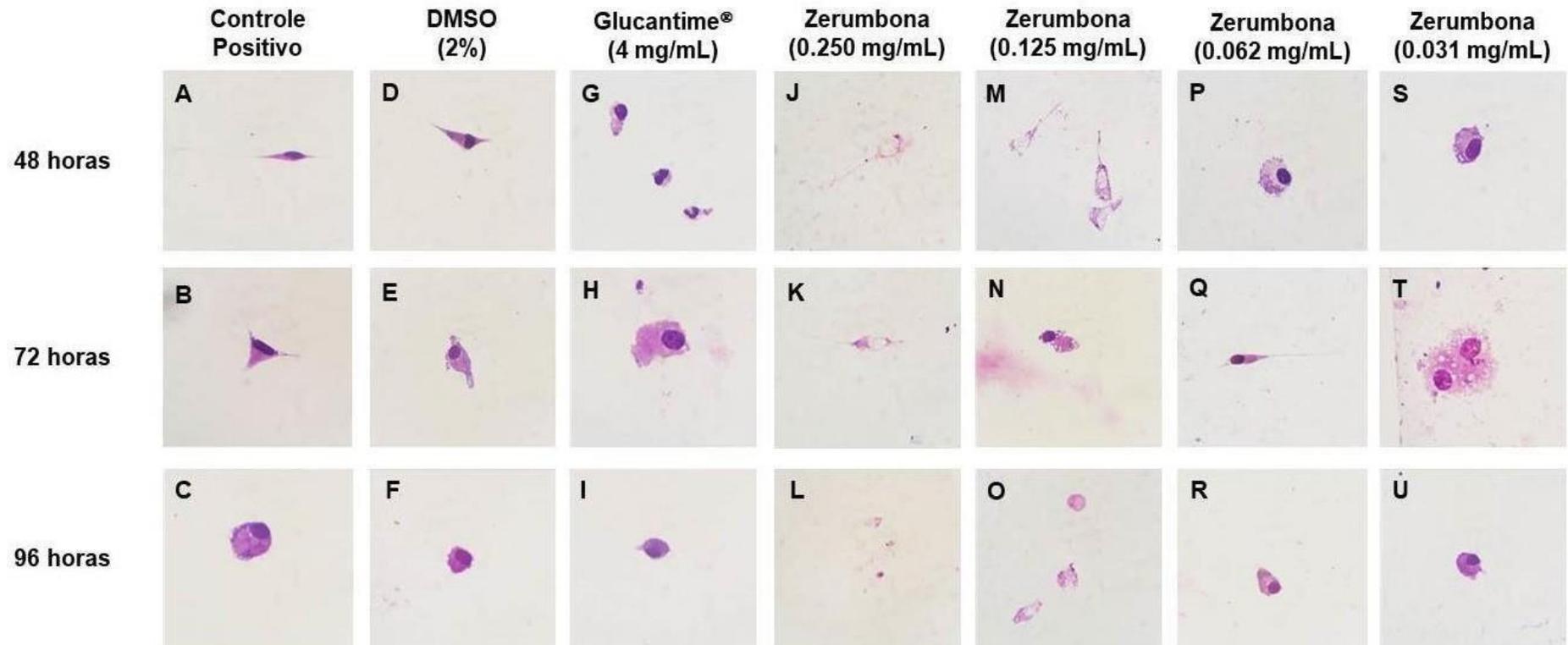


Figura 10. Morfologia dos macrófagos peritoneais murinos (BALB/c, *Mus musculus*) após 48, 72 e 96 horas de tratamento com zerumbona. A, B e C - controle positivo com macrófagos não tratados. D, E e F - macrófagos tratados com DMSO (2%). G, H e I - macrófagos tratados com Glucantime® (4 mg/mL). J, K e L - macrófagos tratados com zerumbona (0.250 mg/mL). M, N e O - macrófagos tratados com zerumbona (0.125 mg/mL). P, Q e R - macrófagos tratados com zerumbona (0.062 mg/mL). S, T e U - macrófagos tratados com zerumbona (0.031 mg/mL). 1000x.

No controle positivo é possível observar que as células não apresentam alterações morfológicas, sendo possível identificar citoplasma e núcleo (Figura 10A - 10C). Entretanto, macrófagos que foram tratados com a zerumbona nas concentrações de 0.250 e 0.125 mg/mL durante o período de incubação de 48 - 96 horas, foi observado-debris celulares e células anucleadas (Figura 10J - 10O).

Nas concentrações 0.062 e 0.031 mg/mL da zerumbona as células apresentaram morfologia semelhante ao observado no controle com Glucantime® e DMSO, entretanto é possível observar que as mesmas apresentaram bordas degradadas e intensa vacualização (Figura 10P - 10U).

Os controles DMSO na concentração de 2%, e o Glucantime® na concentração de 4 mg/mL em todo o período de incubação não apresentaram alterações morfológicas e foi observado a presença de poucos vacúolos (Figura 10D - 10I).

5.6. Atividade da zerumbona contra amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

O tratamento com a zerumbona sob formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* foi avaliado quanto à morfologia e taxa de infecção no período de incubação de 72 a 96 horas.

Como controle negativo foram utilizados macrófagos peritoneais infectados não tratados e macrófagos peritoneais infectados tratados com DMSO, e como controle positivo foi utilizado macrófagos peritoneais infectados tratados com Glucantime®. Foram realizados registros fotográficos dos macrófagos após a infecção como mostra a figura 11.

Leishmania (Leishmania) amazonensis

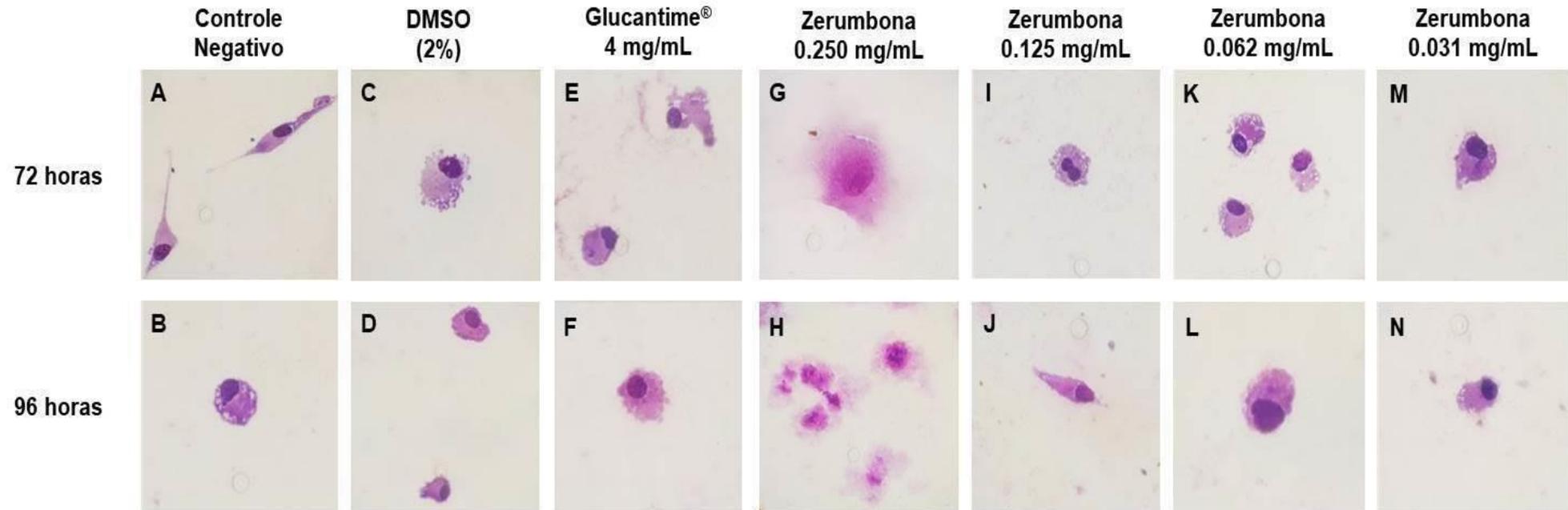


Figura 11. Macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) após 72 e 96 horas de tratamento com a zerumbona. A e B - macrófagos infectados e não tratados (controle negativo). C e D - macrófagos infectados expostos ao DMSO (2%). E e F - macrófagos infectados expostos ao Glucantime® (4 mg/mL). G e H - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.250 mg/mL). I e J - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.125 mg/mL). K e L - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.062 mg/mL). M e N - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.031 mg/mL). 1000x.

O controle negativo, o DMSO e o Glucantime® apresentaram amastigotas internalizadas e vacúolos parasitóforos (Figura 11A - 11F).

Os macrófagos infectados e tratados com a zerumbona na concentração de 0.250 mg/mL, apresentaram degradação celular sendo observado em grande parte restos celulares e células infectadas com intensa vacualização (Figura 11G e 11H). As concentrações 0.062 e 0.031 mg/mL apresentaram células estruturadas, espreiadas e infectadas com amastigotas e intensa vacuolização (Figura 11I - 11N).

Em microscopia óptica, foi realizada a quantificação de macrófagos infectados e não infectados com objetivo de avaliar a taxa de infecção nos períodos de 72 e 96 horas (Figura 12).

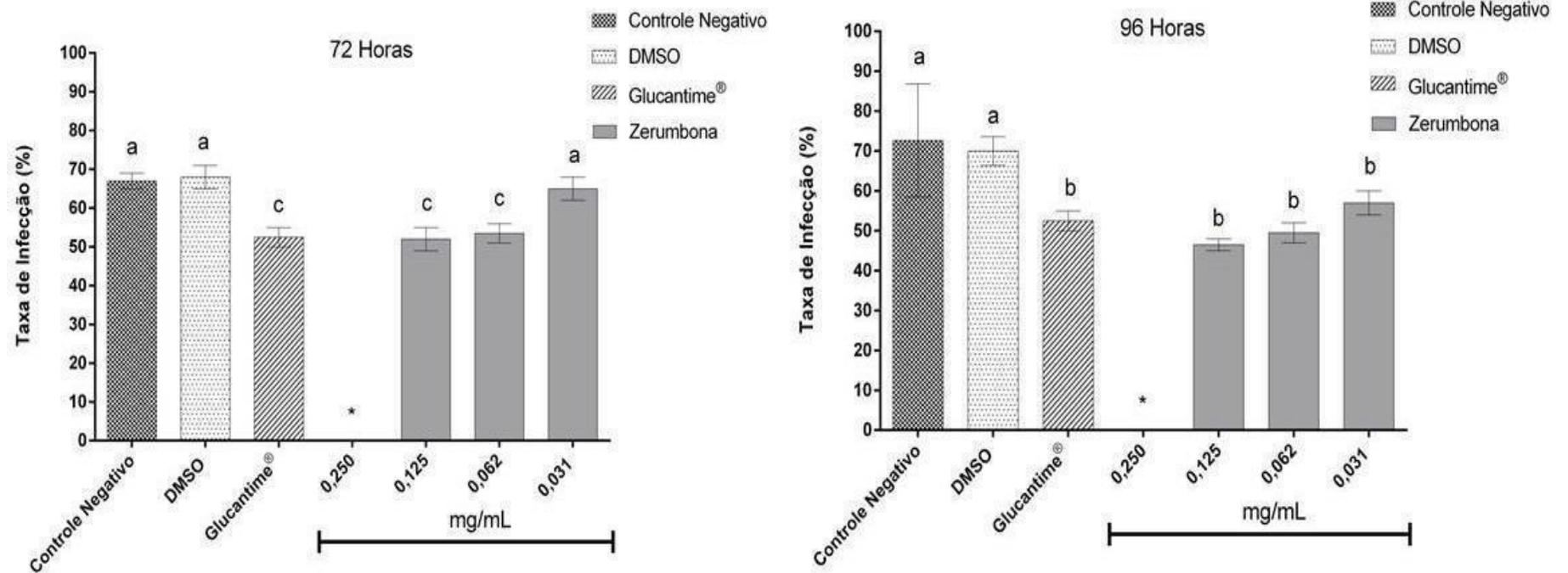


Figura 12. Efeito da zerumbona em amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), em 72 e 96 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação aos controles: DMSO (2%) e Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo (macrófagos infectados e não tratados). Letras diferentes representam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). *= não foi possível quantificar, células viáveis em número insuficiente.

Não foi possível definir a taxa de infecção na concentração de 0.250 mg/mL no período de 72 e 96 horas devido não apresentar células viáveis em número suficiente para quantificação. Quanto a avaliação da taxa de infecção nas demais concentrações foram descritas a seguir.

A avaliação da taxa de infecção de macrófagos infectados e tratados com zerumbona no período de 72 horas, apresentou nas concentrações 0.125 mg/mL e 0.062 mg/mL resultados similares porém sem diferença significativa ao que foi observado para o Glucantime®, com média da taxa de infecção em 53%, com exceção da concentração 0.031 mg/mL. Quando comparados os tratamentos em relação ao controle negativo e DMSO foi observado diferença estatística com as concentrações 0.125 mg/mL e 0.062 mg/mL, com exceção da concentração 0.031mg/mL.

Quando avaliado os efeitos da zerumbona sobre a proliferação de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* é possível observar que no tempo de exposição de 96 horas houve redução das taxas de infecção em todas as concentrações testada quando comparado ao período de 72 horas, com as concentrações 0.125 mg/mL e 0.062 mg/mL apresentando resultados inferiores porém sem diferença significativa ao observado com Glucantime® com taxas de infecção de 46% e 50%, respectivamente. Quando comparados os tratamentos em relação ao controle negativo e DMSO foi observado diferença estatística com as concentrações 0.125 - 0.031mg/mL.

Considerando todos os períodos testados, sugere-se que as concentrações 0,125 mg/mL e 0,062mg/mL apresentaram atividade antileishmania com resultados promissores em tratamento a longo prazo como demonstrado no período de 72 e 96 horas.

5.7. Atividades da zerumbona contra amastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

O tratamento com a zerumbona sob formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) guyanensis* foi avaliado quanto à morfologia e taxa de infecção no período de incubação de 72 a 96 horas.

Como controle negativo foram utilizados macrófagos peritoneais infectados não tratados e macrófagos peritoneais infectados tratados com DMSO, e como controle positivo foi utilizado macrófagos peritoneais infectados tratados com Glucantime®. Foram realizados registros fotográficos dos macrófagos após a infecção como mostra a figura 13.

Leishmania (Viannia) guyanensis

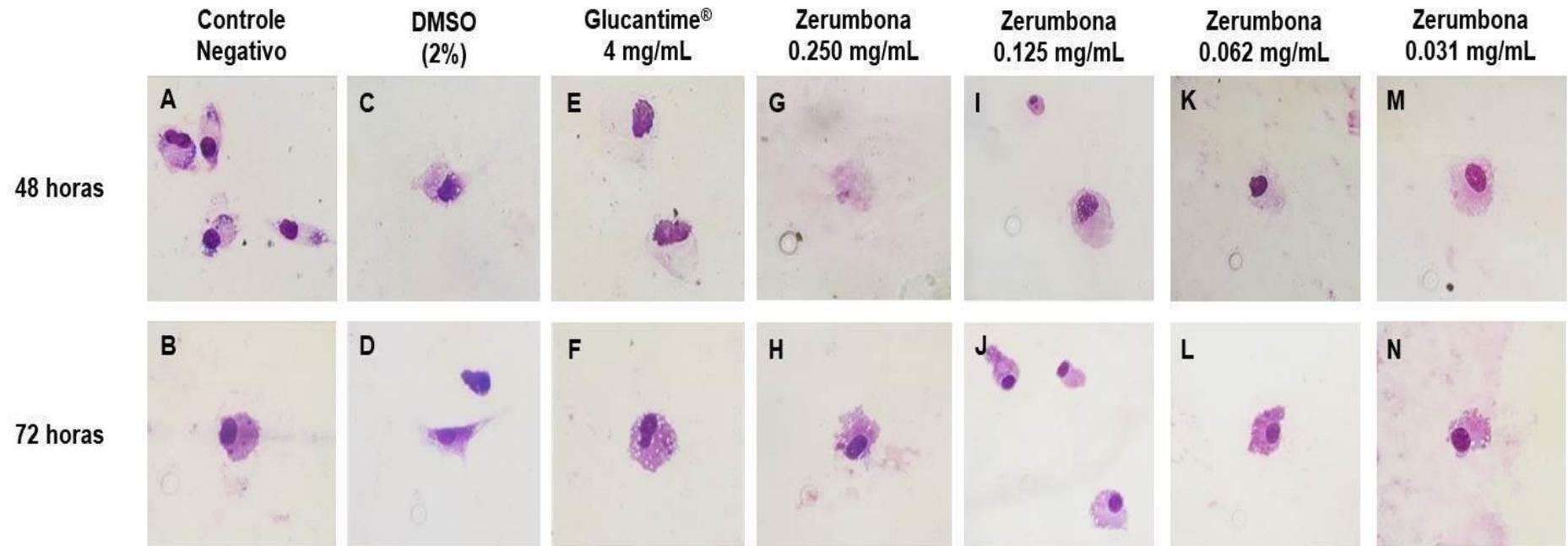


Figura 13. Macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/2009/IM4147) após 48 e 72 horas de tratamento com a zerumbona. A e B - macrófagos infectados e não tratados (controle negativo). C e D - macrófagos infectados expostos ao DMSO (2%). E e F - macrófagos infectados expostos ao Glucantime® (4 mg/mL). G e H - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.250 mg/mL). I e J - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.125 mg/mL). K e L - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.062 mg/mL). M e N - macrófagos infectados expostos a zerumbona (0.031 mg/mL). 1000x.

O controle negativo, o DMSO e o Glucantime® apresentaram amastigotas internalizadas e vacúolos parasitóforos (Figura 13A - 13F).

Os macrófagos infectados e tratados com a zerumbona na concentração de 0.250 mg/mL, apresentaram degradação celular sendo observado em grande parte restos celulares com destruição do núcleo (Figura 13G) e foi possível observar também macrófagos infectados com amastigotas, entretanto apresentando intensa vacualização e degradação do citoplasma (Figura 13H). As concentrações 0.062 e 0.031 mg/mL não apresentaram células com destruição do núcleo, porém apresentaram amastigotas internalizadas e intensa vacuolização (Figura 11I - 11N).

Em microscopia óptica, foi realizada a quantificação de macrófagos infectados e não infectados com objetivo de avaliar a taxa de infecção nos períodos de 72 e 96 horas (Figura 14).

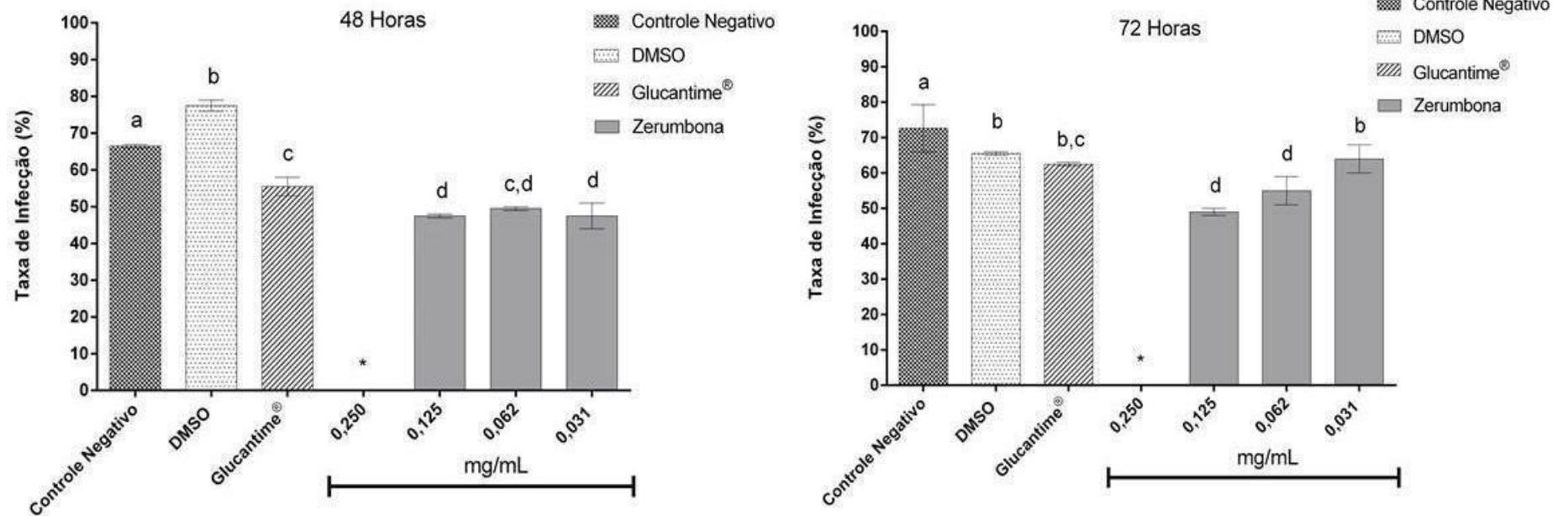


Figura 14. Efeito da zerumbona em amastigotas intracelulares de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/2009/M4147), em 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes concentrações em comparação aos controles: DMSO (2%) e Glucantime® (4 mg/mL) e controle negativo (macrófagos infectados e não tratados).. Letras diferentes representam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). *= não foi possível quantificar, células viáveis em número insuficiente.

Não foi possível definir a taxa de infecção na concentração de 0.250 mg/mL no período de 48 e 72 horas devido não apresentar células viáveis em número suficiente para quantificação. Quanto a avaliação da taxa de infecção nas demais concentrações foram descritas a seguir.

A avaliação da taxa de infecção de macrófagos infectados e tratados com zerumbona no período de 48 horas em todas as concentrações testadas apresentou resultados inferiores aos observados para o Glucantime® com média da taxa de infecção em 48%, e diferença significativa para as concentrações 0.125 mg/mL e 0.031 mg/mL. Quando comparados os tratamentos em relação ao controle negativo e DMSO foi observado diferença estatística com as concentrações 0.125 - 0.031mg/mL.

Quando avaliado os efeitos da zerumbona sobre a proliferação de formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis* é possível observar que no tempo de exposição de 96 horas a concentração 0.125 mg/mL manteve a taxa de infecção inferior a 50%, enquanto as concentrações 0.062 e 0.031 mg/mL apresentam taxas mais elevadas sendo 54% e 64%% respectivamente. Embora com a diminuição da concentração tenha sido observado o aumento das taxas de infecção, os valores descritos ainda se encontram inferiores e com diferença significativa ao descrito para o controle com Glucantime® com exceção da concentração 0.031mg/mL. Quando comparados os tratamentos em relação ao controle negativo e DMSO foi observado diferença estatística com as concentrações testadas com a exceção da 0.031mg/mL em relação ao DMSO.

Considerando todos os períodos testados, sugere-se que as concentrações 0,125 mg/mL e 0,062mg/mL apresentaram atividade com resultados promissores no período de 72 e 96 horas.

6. DISCUSSÃO

O ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* é caracterizado por diferentes fases de desenvolvimento, determinadas como fase Lag (adaptação ao meio de cultivo), fase exponencial (fase logarítima ou de crescimento), fase estacionária e a fase de declínio. Para as espécies de *Leishmania* spp. determinar a fase exponencial e estacionária é fundamental, uma vez que Cysne - Finkelstein et al. (1998) sugerem que estas fases de crescimento estão relacionadas ao sucesso na obtenção e manutenção dos parasitas.

Em meio de cultivo *in vitro* as formas promastigotas diferenciam-se em formas semelhantes às metacíclicas infectantes encontradas no inseto vetor, reproduzindo o processo de metaciclogênese que acontece no hospedeiro invertebrado, com isso a determinação da fase exponencial e estacionária possibilita definir os dias em que as espécies apresentam maior probabilidade de estarem infectantes (ALVES et al., 2015).

A curva de crescimento estabelecida para os parasitas de *L. (L.) amazonensis* apresentou perfil semelhante ao descrito por Almeida (2012) e Wyrepkowski (2016) portanto, em todos os experimentos com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, optou-se por utilizá-los entre o 3º e 4º dia do crescimento devido ser a fase em que esses parasitas se encontram em forma infectante. Quanto à curva de crescimento estabelecida para a espécie de *L. (V.) guyanensis*, os resultados foram semelhantes ao estudo desenvolvido por Lima (2012), logo optou-se por utilizar parasita entre o 5º e 6º dia de crescimento.

A zerumbona pertence a uma classe de metabólitos secundários que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, estando entre as três principais classes de metabólitos secundários vegetais que apresentam atividade antiprotozoária (VIEIRA et al., 2015). Alguns trabalhos serão relatados adiante em comparação com os resultados obtidos neste estudo.

Em trabalho realizado por Mukherjee et al. (2015) foi utilizado a zerumbona extraída do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith coletados de Manipur, nordeste Índia, contra formas promastigotas de *L. (L.) donovani*. Mukherjee et al. (2015) consideraram que nos períodos de 48 e 96 horas a zerumbona apresentou redução de 53,43% do número de parasitas. De forma similar Singh et al. (2014),

também utilizando zerumbona extraída do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, coletados de Manipur, nordeste da Índia, descreveu o CE₅₀ <1,6 ug/mL contra formas promastigotas da espécie de *L. (L.) donovani*.

Nossos dados tanto para a espécie de *L. (L.) amazonensis* quanto para *L. (V.) guyanensis* corroboram com ambos os trabalhos descritos, no qual, eles observaram que a zerumbona possui efeito a longo prazo contra formas promastigotas com reduções máximas de viabilidade parasitária observadas em 72 e 96 horas de tratamento, além deste trabalho apresentar CE₅₀ promissores por ser inferior ao valores descritos por eles.

Peculiarmente, são raros os estudos que testaram a zerumbona contra espécies de *Leishmania spp.* Por outro lado, alguns sesquiterpenos apresentam estudos para avaliar a atividade antileishmania contra formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*.

Sartoreli et al. (2016) utilizando lactonas sesquiterpênicas de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (Asteraceae), popularmente conhecida como aruca, contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* descreve que dois dos compostos testados apresentaram o CE₅₀ de 1,7 e 4,6 ug/mL respectivamente.

De forma similar Andrea et al. (2016) avaliando a atividade antileishmania de lactonas sesquiterpênicas contra a espécie de *L. (L.) amazonensis* observaram uma atividade moderada com CE₅₀ 1,6 uM/mL.

Como demonstrado, o presente estudo também apresentou atividade antileishmania da zerumbona contra formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis*, porém nenhum outro estudo foi encontrado utilizando a zerumbona ou outras substâncias terpênicas contra formas promastigotas desta espécie.

Um trabalho realizado por Scotto et al. (2017) utilizou óleo essencial de *Varronia schomburgkii* (DC.) Borhidi (Cordiaceae) rico em sesquiterpenos contra a espécie de *L. (V.) guyanensis*, eles observaram que o CE₅₀ > 50 ug/mL em 48 horas não apresentava potencial atividade antileishmania. Esta observação pode ser explicada quer pela ausência de atividade antileishmania desses compostos ou pelo fato de que sua atividade possa ter sido inibida por efeitos antagonistas de outros constituintes presentes no óleo, mesmo que em menores porporções.

Entretanto, outros autores apresentaram resultados utilizando terpenos contra outras espécies de *Leishmania spp.*, como Toledo et al. (2014) que testou lactonas

sesquiterpênicas isoladas de *Tithonia diversifolia* contra formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e mostrou-se muito eficaz com índice de letalidade de 6 a 37,4 μM .

Lopes et al. (2016) utilizou o sesquiterpeno bisabolol em formas promastigotas de *L. (L.) tropica*, espécie causadora de leishmaniose cutânea no Velho Mundo, eles observaram o CE_{50} de 22,6 μM .

Pode - se verificar que, embora ambos os resultados citados acima, não sejam semelhantes ao encontrado nesse estudo, Toledo et al. (2014) foi o mais próximo apresentando atividade promissora de uma substância terpênica frente as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

O mecanismo de ação da atividade antileishmania da zerumbona atualmente é desconhecido. Pelos resultados obtidos neste trabalho não é possível inferir qual o mecanismo de ação utilizado pela zerumbona para obter a morte das formas promastigotas, porém foi observado que para as duas espécies testadas na concentração 0.250 mg/mL os parasitas se apresentavam mais lentos e com o decorrer do período de incubação foi observado debris celulares.

Pesquisadores como Mukherjee et al. (2016) observaram que as promastigotas tratadas com zerumbona apresentaram alteração morfológica, dentre elas aspecto arredondado, perda do flagelo e membrana celular porosa confirmada por Microscopia Eletrônica de transmissão (MET), em seu trabalho eles descrevem que a zerumbona apresenta natureza citotóxica contra formas promastigotas de *L. (L.) donovani* e sugerem que a atividade leishmanicida pode estar relacionada a condensação do DNA que induz a célula a sofrer apoptose, ou a estresse oxidativo seguido do aumento da peroxidação lipídica que leva a alteração do potencial da membrana mitocondrial também levando a apoptose.

Dados similares são descritos por Sartorelli et al. (2016), ao avaliarem a atividade de lactonas sesquiterpênicas de *Calea pinnatifida* e demonstrarem atividade potente contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o que levou a perda de sua morfologia estrutural clássica evidenciada por MET.

Como podemos observar, este trabalho apresentou resultados semelhantes e promissores para as duas espécies de *Leishmania* testadas contra formas promastigotas, embora a maioria dos estudos descritos tenham sido realizados com espécies do gênero *Leishmania*, os achados corroboram com os resultados descritos para ambas as espécies testadas neste trabalho.

A zerumbona é um sesquiterpeno que apresenta atividade antitumoral e antiproliferativa contra células cancerígenas (TAKADA et al. 2005). Neste trabalho macrófagos peritoneais murinos foram expostos a zerumbona em diferentes concentrações para avaliar a citotoxicidade, no qual foi observado que quando exposto as maiores concentrações testadas (0.125 e 0.250 mg/mL) apresentaram baixa viabilidade celular que persistia em todo o período de incubação, o reflexo desses resultados também foram vistos ao avaliarmos a morfologia dos macrófagos expostos a zerumbona, onde nas maiores concentrações foram observadas células degradadas, perda do núcleo e debris celulares.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a citotoxicidade da zerumbona frente a macrófagos peritoneais murinos, porém resultados semelhantes foram descritos por Hamid et al. (2017) ao avaliar a citotoxicidade da zerumbona frente as células murinas do timo, no qual em seu achados descrevem que a substância apresenta efeitos citotóxicos dependentes da dose, com viabilidade celular em 24 horas de $5.17 \pm 0.37\%$, em 48 horas $3.58 \pm 0.35 \%$ e em 72 horas $4.12 \pm 0.34\%$ na maior concentração testada (30 ug).

Lei et al. (2017) ao investigar os efeitos morfológicos da zerumbona na linhagem celular Eca-109 de câncer de esôfago humano, descreveram em 48 e 72 horas morte celular proporcional ao aumento da concentração de zerumbona (10 umol/L e 20 umol/L) quando comparadas ao grupo controle de células sem tratamento. Hamid et al. (2017) ao estudar a citotoxicidade da zerumbona frente a células murinas do timo observaram que a zerumbona induziu dano significativo ao DNA e verificaram que a citotoxicidade foi alcançada principalmente por apoptose.

Embora os macrófagos peritoneais murinos não sejam células proliferativas, quando tratados com a zerumbona apresentaram resultados semelhantes aos trabalhos descritos anteriormente.

Os bioensaios contra formas amastigotas para as espécies *L. (L.) amazonensis* no período 72 e 96 horas e *L. (V.) guyanensis* no período de 48 e 72 horas apresentaram resultados promissores sendo avaliada inibição de até 50 % da taxa de infecção para ambas as espécie. Alguns trabalhos serão relatados adiante que corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

Mukherjee et al. (2015) ao avaliar a atividade da zerumbona extraída do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith contra formas amastigotas de *Leishmania*

donovani apresentou em 48 horas inibição da proliferação de até 50% de amastigotas internalizadas em macrófagos na concentração de 5 μ M.

Como descrito anteriormente são raros os estudos que testam a zerumbona contra espécies de *Leishmania spp.* Por outro lado, alguns terpenos apresentam estudos para avaliar a atividade antileishmania contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Um trabalho realizado por Lima, (2014) no qual avaliou a atividade leishmanicida do terpeno DCTN extraído de *Croton ajucara* Benth uma planta do região amazônica conhecida popularmente como sacaca, contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em macrófagos peritoneais murinos apresentou concentração inibitória de 0.47 μ g/mL, 0.28 μ g/mL e 0.16 g/mL para os períodos de 24, 48 e 72 horas.

Rottini, (2011) por sua vez testando o sesquiterpeno bisabolol contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentou taxa de infecção de até 86% em 24 horas.

Como demonstrado, o presente estudo também apresentou resultados da atividade da zerumbona contra formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis*, porém nenhum outro estudo foi encontrado utilizando a zerumbona ou outras substâncias terpênicas contra formas amastigotas desta espécie.

Toledo et al. (2014) testou lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Tithonia diversifolia* contra formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e indicou que três dos oito compostos testados quando comparados ao controle negativo foram capazes de reduzir significativamente o índice de infecção após 48 horas de tratamento.

Como descrito, este trabalho apresentou resultados promissores para as duas espécies de *Leishmania* testadas contra formas amastigotas, apresentando melhores resultados para a espécie de *L. (L.) amazonensis* seguida de *L. (V.) guyanensis*. Embora a maioria dos estudos descritos tenham sido realizados com espécies do gênero *Leishmania*, os achados corroboram com os resultados descritos para ambas as espécies testadas neste trabalho.

Em vista dos resultados apresentados, é suposto que a zerumbona apresenta atividade para as ambas espécies testadas nesse trabalho, embora para *L. (L.) amazonensis* é observado que para as duas formas evolutivas ocorre atividade a longo prazo com efeito cumulativo, enquanto que para a espécie *L. (V.) guyanensis*

é observado efeito imediato progredindo para uma atividade a longo prazo com efeito acumulativo. A diferença da atividade apresentada para as duas espécies representa um dos desafios na busca para novas drogas para o tratamento de leishmaniose.

Através desse estudo também foi possível observar que não há um padrão para os testes de novas substâncias, pois os estudos apresentam diferentes concentrações das drogas, diferentes cepas e formas evolutivas de parasitas e linhagens de células diferentes dificultando a comparação dos resultados encontrados.

7. CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível concluir que:

- Pela primeira vez é mostrada a atividade da zerumbona contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* espécies causadoras de LTA;

- A zerumbona apresentou-se promissora para as duas espécies, embora com comportamento diferente em ambas as formas evolutivas do parasita, apresentando atividade cumulativa e gradual, aumentado no decorrer do tempo para a espécie *L. (L.) amazonensis* e efeito imediato progredindo para uma atividade a longo prazo com efeito cumulativo para *L. (V.) guyanensis*, durante todo o tratamento;

- A zerumbona apresentou atividade antileishamnia contra formas promastigotas da espécie de *L. (L.) amazonensis* no período de 48 - 96 horas e da espécie de *L. (V.) guyanensis* no período de 24 - 72 horas;

- A zerumbona apresentou atividade antileishamnia contra formas amastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* nas concentrações de 0.125 mg/mL e 0.062 mg/mL com taxas de infecção de até 46% e 50%, respectivamente, no período de 96 horas;

- A zerumbona apresentou atividade antileishamnia contra formas amastigota da espécie *L. (V.) guyanensis* nas concentrações 0.125 mg/mL e 0.062 mg/mL com taxas de infecção de até 49% e 54% respectivamente, no período de 72 horas;

- A zerumbona apresentou citotoxicidade aos macrófagos periteneais murinos nas concentrações de 0.250 mg/mL e 0.125 mg/MI;

- Esses resultados encorajam para a progressão dos estudos com a zerumbona em ensaios *in vivo* como candidados ao tratamento da LC.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, o grupo pretende dar continuidade nos estudos pré-clínicos *in vivo* contra as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* e estudar a possibilidade de produzir uma formulação tópica.

-.

REFERÊNCIAS

AEDO, J. R. N. Atividade de álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. 2007 (Dissertação) - Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da cidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AKHOUNDI, M., et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *Neglected Tropical Diseases*. 10(3): e0004349. 2016.

ALMEIDA, G. G. Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida in vitro e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia. 2012.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombiana. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, vol. 10 (3): 853-882, set.-dez. 2003

ALVES, I. et al. and Leishmania (Leishmania) amazonensis Clinical Field Isolates , as Evaluated by Morphology , Complement Resistance , and Infectivity to Human Macrophages. *BioMed Research International*. v. 2015, n. Lcl, 2015.

BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Revista Química Nova*. Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.679- 688, 2009.

BASTOS, T. S. A. Estudos introdutórios sobre flebotomíneos. *Ciência Animal*. Goiás, 2012.

BASTOS, M.M. et al. Quimioterapia antileishmania: Uma revisão bibliográfica. *Revista Virtual de Química*, (6): 2072-2104., 2016.

BASANO, S. D. A.; CARMARGO, L. M. ARANHA. Leishmaniose tegumentar americana : histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328-337, 2004.

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

BOLZANI SV; JUNIOR CV; Os produtos naturais e a química medicinal moderna . *Química Nova*, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006.

BLANCO, V.R; NASCIMENTO-JÚNIOR,N.M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. *Revista Virtual de Química*, 3:816-876, 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017.

BULA PENTOXIFILINA: Pentoxifilina. Manaus: Novamed fabricação de produtos farmacêuticos Ltda. Bula de remédio. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16049072016&pIdAnexo=3357861

CARVALHO, A. U. C. Avaliação do Uso de Técnicas de MMGBSA na Triagem Virtual de Bibliotecas de Ligantes para o Desenvolvimento de Fármacos contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. 2011 (Dissertação). Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. Paraíba. 2011.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta Médica da Bahia*. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98-106, 2008.

CASTELLANO, R. L. C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. *Parasite*, p. 1-19, 2005.

CDC. Leishmaniasis. Resources for Health Professionals. August 4, 2016. WWW.cdc.gov

CHIA, J. S. M. et al. ScienceDirect Zerumbone alleviates chronic constriction injury-induced allodynia and hyperalgesia through serotonin 5-HT receptors. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 83, p. 1303-1310, 2016.

CHRUSCIAK T. A. Pesquisa clínica para avaliar a eficácia e segurança da miltefosina oral em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania guyanensis*, comparada ao tratamento com antimonial pentavalente. 2009. 132 f. (tese) - Universidade do Estado do Amazonas/Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, 2009.

CYSNE-FINKELSTEIN, L. et al. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.*, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998.

COELHO, L. I. A. R. C. Caracterização de *leishmania* spp em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região Norte, Brasil. 2010. 108 f. (Tese) - Saúde pública, Fundação Oswaldo Cruz Centro De Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, 2010.

CORREA, E. A. Aspectos epidemiológico e clínico-laboratoriais da Lesihmaniose Tegumentar Americana nos subespaços de 07 e 08 no estado de Rondônia - Brasil.

2007 (Dissertação) - curso em Ciências da saúde, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2007.

COSTA, J.M.L. Leishmaniose Tegumentar Americana: origens e histórico no Brasil. *Acta Amazonica* 22: 71-77, 1992.

CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan; 19(1): 111-126.

DEWIK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Ottawa J. Wiley. 2. ed. 507p. 2002.

FADZIL, W. B. A. Extraction of ZZ. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. December, p. 1689-1699, 2013.

FERREIRA, C.C.; MAROCHIO, G.G.; PARTATA, A.K. Estudo sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana com enfoque na farmacoterapia. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, 5(4), 2012.

FRÉZARD, F. SCHETTINI, D. lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio, *Química Nova*, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

FIGUEIRA, L. DE P. Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional. 180 f. 2013. (Tese) - Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

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

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. Colaboração Para O Conhecimento Do Histórico Da Leishmaniose Tegumentar Americana No Brasil : Possíveis Casos Entre Escravos Na Vila De Vassouras-Rj , Nos Anos 1820 a 1880. v. 43, n. 1, p. 7-25, 2014.

GUIMARÃES, L. H et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta médica Bahia*, 75:1Jan-Jun:66-74, 2005.

GONTIJO B; CARVALHO M.L. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 71-80, 2013.

GORDON, S.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A.; Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis : evidences for a two stage process. *Journal of Experimental Medicine*. 140(4): 995-1010, 1974.

Gosh, C. S. et al. American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent leishmania species in the state of Tocantins, Brazil, 2011-2015. *Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine*, 59-91. 2017.

GOTO H., LINDOSO J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. Expert review of anti-infective therapy. 2010 Apr;8(4):419-33

HAMID, S. et al. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Zerumbone on WEHI 7.2 Wild Type Murine Thymoma Cells. Journal of Agricultural Science. Vol. 9, No. 13; 2017

IGARASHI, Y. et al. Possible Contribution of Zerumbone-Induced Proteo-Stress to Its Anti-Inflammatory Functions via the Activation of Heat Shock Factor 1. Journal Plos one v. 2, p. 1-17, 2016.

JEON, M. et al. Chemico-Biological Interactions Elevated IL-1 b expression induces invasiveness of triple negative breast cancer cells and is suppressed by zerumbone. Chemico-Biological Interactions n, v. 258, p. 126-133, 2016.

JUNIOR, I. A. S. Avaliação da metaciclo-gênese in vitro de Leishmania (V.) braziliensis e Leishmania (L.) amazonensis. 2013 (Dissertação) Universidade Federal de Goiás, 2013.

KADER, G. et al. Antimicrobial activities of the rhizome extract of Zingiber zerumbet Linn. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 1, n. 5, p. 409-412, 2011.

KITAYAMA, T. et al. Chemistry of zerumbone. 2. Regulation of ring bond cleavage and unique antibacterial activities of zerumbone derivatives. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, v. 65, n. 10, p. 2193-2199, 2001.

KOGA, A. Y.; BELTRAME, F. L.; PEREIRA, A. V. Several aspects of Zingiber zerumbet : a review. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 26, n. 3, p. 385-391, 2016

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAISON R, SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Dendrick R (eds) The leishmaniasis in biology and medicine, Biology and Epidemiology, Academy Press, London, 1-20, 1987.

LEI, C. et al. Research on the mechanisms of zerumbone in inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human esophageal cancer cell line Eca-109. Biomedical Research 2017, 28 (20): 8765-8768. 2017.

LIMA, E. O. Estudo da variabilidade genética de Leishmania (Viannia) braziliensis Vianna, 1911 de diferentes regiões do Brasil. 2010 (Tese) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LIMA, J. P. S. Avaliação da atividade leishmanicida de Annona Mucosa, A. sericea e Ephedranthus amazonicus frente a Leishmania amazonensis, Leishmania braziliensis

e *Leishmania guyanensis*. 2012. (Tese) Universidade Federal do Amazonas, Amazonas. 2012.

LIMA, G. S. Estudo da Atividade Tripanossomicida e Leishmanicida de Extrato , Frações e Terpenos de. 75 f. 2014. (Tese) Ciência, Tecnologia e Inovação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.

LOPES, V.C. et al. The sesquiterpene (2)-a-bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. *Apoptosis*. 2016.

MARTINS, G. A. DE S.; LIMA, M. D. DE. Leishmaniose: Do Diagnostico Ao Tratamento. *Enciclopédia Biosfera*, v. v.9, p. 2556-2569, 2013.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHUBACH, A.O. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 39-56. 2010.

MELLO, C. X. DE. Otimização do preparo de meio de cultura Schneider ® para o isolamento de *Leishmania* Cintia Xavier de Mello. *Controle de Qualidade em saúde*, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

MENEGATTI, R; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. No 3, Maio, 2001.

MEWALAL, R. et al. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. *Trends in Biotechnology*, v. xx, p. 1-14, 2016.

MIRANDA, L. F. C. Sensibilidade ao antimônio pentavalente in vitro de amostras de *leishmania* (*viannia*) *braziliensis* isoladas antes e após o tratamento de pacientes com falha terapêutica. (dissertação) - pesquisa clínica em doenças infecciosas, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

MONTEIRO, C. M. C. C. Leishmaniose Tegumentar Americana : uma abordagem farmacológica. (Dissertação) - Desenvolvimento em tecnologia Farmacéutica, Goiânia. Goiás. 2009.

MUKHERJEE, D., et al. Induction of apoptosis by zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet* (L .) Smith in protozoan parasite *Leishmania donovani* due to oxidative stress. v. 0, n. 1, p. 48-55, 2015.

MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2011.

NASCIUTTI, P. R. Desenvolvimento De Novos Fármacos. 2012.

NAIFF et al. epidemiological and nosological aspects of *leishmania naiffi* lainsou e shaw 1989. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, V 86(3). 1991.

NAIFF JUNIOR, R. D. et al. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Rio Preto Da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* , vol. 38 (2): 103-114, 2009.

NAKAMURA, Y. et al. Zerumbone , a tropical ginger sesquiterpene , activates phase II drug metabolizing enzymes. *Federation of European Biochemical Societies* v. 572, p. 245-250, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEVES, D. P. *Parasitologia dinâmica*. Editora Atheneu, 3 ed. São Paulo, 2009.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Report of the Fifth Consultative ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2012. <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en>.

PAHO/WHO. Informe Epidemiológico das Américas. Report Leishmaniasis No 3. p. 3-7, 2015.

PENNA, G. O., et al. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 86: 5: 865-877, 2011.

PEREIRA, L. I. D. A. Avaliação dos monócitos na Leishmaniose Tegumentar Americana. 103 f (Tese) - Medicina Tropical em Saúde Pública, Goiânia. Goiás. 2012.

PESSÔA, S.M. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

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

RAHMAN, H. S. et al. Biomedical properties of a natural dietary plant metabolite, Zerumbone, in cancer therapy and chemoprevention trials. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

RIBEIRO - GOMES, F.L; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Cellular and infection microbiology*, v. 2.2012.

ROTTINI, M. M. Ação de óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaios experimentais in vitro com *Leishmania amazonensis*. (Dissertação). 2011. Pós-graduação em Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ. 2011

SCORZA, M.B; CARVALHO, M.E.; WILSON, E.M. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6): 1296, 2017.

SCOTTO, C. I. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Varronia schomburgkii* (DC.) Borhidi (Cordiaceae) from plants cultivated in French Guiana. *Journal of Essential Oil Research*. 2017.

SIEW, J. et al. ScienceDirect Zerumbone alleviates chronic constriction injury-induced allodynia and hyperalgesia through serotonin 5-HT receptors. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, v. 83, p. 1303-1310, 2016.

SILVA, P. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina* V.22 (1) , 2008

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFSC/UFRGS. 6 ed. 2007

SINAN, 2017. Doenças e agravos (<http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-tegumentar-americana>). Acessado em 07/02/18.

SINGH, O. M. P.; SINGH, B; CHAKRAVARTY, J; SUNDAR, S. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infectious Diseases of Poverty* 5:19, 2016.

SINGH, C. B. et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil of rhizome of *Zingiber zerumbet* (L .) Smith. v. 3, n. 3, p. 130-133, 2014

SOARES, F.V. Estudos pré-clínicos com nanopartículas de antimônio pentavalente no tratamento da leishmaniose cutânea. 177 f (Tese) - Biotecnologia, Manaus. Amazonas. 2017.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*. 16(2):237-52, 2015.

TAKADA, Y.; MURAKAMI, A.; AGGARWAL, B. B. Zerumbone abolishes NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion. *Oncogene*, v. 24, n. 46, p. 6957-6969, 2005.

TOLEDO, S. J. et al. In Vitro Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* Promastigotes and Amastigotes. *Molecules*. 2014.

TZENG, T.-F. et al. The ethanol extract of *Zingiber zerumbet* Smith attenuates non-alcoholic fatty liver disease in hamsters fed on high-fat diet. *Food and Chemical Toxicology*, v. 65, p. 33-42, 2014.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil : revisão histórica da related to the origin , expansion and etiology . Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

VIEIRA, P. DE B. et al. Natural and synthetic compound anti-Trichomonas vaginalis: an update review. Parasitology Research, v. 114, n. 4, p. 1249-1261, 2015.

VIANNA G. Sobre uma nova especie de Leishmania (Nota Preliminar). Bras Med. ;25:411, 1911.

WYREPKOWSKI, C. D. C. Avaliação anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania ferrea* e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose. 2016. 199 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea (2013). Disponível em http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html. Acesso em 28.09.2017.