



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICHELE CRISTINA VENDRAMETTO

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EUPOMATENÓIDE-5, SUBSTÂNCIA
ISOLADA DE FOLHAS DE *Piper regnellii* var. *pallescens*.

MARINGÁ

2006

MICHELE CRISTINA VENDRAMETTO

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EUPOMATENÓIDE-5, SUBSTÂNCIA
ISOLADA DE FOLHAS DE *Piper regnellii* var. *pallescens*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração em Produtos Naturais Biologicamente Ativos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tânia Ueda-Nakamura

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

MARINGÁ

2006

RESUMO

Os principais medicamentos recomendados para o tratamento das leishmanioses cutâneas e viscerais são os derivados dos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), entretanto, estão longe de serem as drogas ideais, pois não são ativos quando administrados oralmente e necessitam de um longo período de tratamento. Além disso, os efeitos tóxicos podem revelar a intolerância destes medicamentos por muitos pacientes. Considerando que a leishmaniose é endêmica em várias regiões do Brasil, a busca de produtos naturais que sejam efetivos no tratamento da leishmaniose é muito importante, pois a disponibilidade de tais produtos poderá contribuir para o controle da doença. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade do eupomatenóide-5, substância isolada das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck., (Piperaceae), sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/75/Josefa. Foi avaliada também a toxicidade da substância sobre cultura de macrófagos J774G8 e o efeito na interação parasita-hospedeiro. O processo de extração e fracionamento das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* foi realizado através de métodos cromatográficos de adsorção chegando ao isolamento da neolignana dihidrobenzofurânica: o eupomatenóide-5. Esta substância foi identificada por análise espectral de RMN ¹H, ¹³C, comparada com dados da literatura. Na concentração de 9µg/ml, apresentou 50% de inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 h de incubação a 28°C. Nessas condições, significativas alterações ultraestruturais do protozoário foram visualizadas através da microscopia eletrônica de transmissão. A toxicidade do eupomatenóide-5 sobre cultura de macrófagos só foi observada em concentração acima da necessária para inibir o crescimento do protozoário. O efeito do

eupomatenóide-5 na interação leishmânia-macrófago é maior quando os parasitas são tratados antes da interação.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*, *Piper regnellii*, atividade antileishmania, plantas medicinais, eupomatenóide-5, neolignanas, citotoxicidade, ultraestrutura.

ABSTRACT

The main remedies recommended to the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis are derived from the pentavalents antimonials such as sodium estibogluconate (Pentostan[®]) and meglumine antimonial (Glucantime[®]), however they are far to be ideal drugs because they are not active when administered orally and need a long period for the treatment. Besides, the side effects can reveal the patients intolerance for this medicaments. Considering that leishmaniasis is endemic in various regions of Brazil, the quest for herbal remedies that are effective for the treatment of this illness is very important, thus the availability of this products could contribute to the its control. The aim of the present work was to investigate the activity of eupomatenoid-5, isolated from leaves of *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae), over promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* strain MHOM/BR/75/Josefa. Toxicity of eupomatenoid-5 on J774G8 macrophages and its effect on host-parasite interaction was also evaluated. The extraction process and fractionation of *Piper regnellii* var. *pallescens* leaves was realized by adsorption chromatography and the compound dihydrobenzofuranic neolignan (eupomatenoid-5) was isolated and characterized by RMN ¹H, ¹³C spectroscopy, comparing to literature data. At 9µg/ml eupomatenoid-5 presented an inhibitory growth concentration of 50% against promastigotes after 72 h at 28°C. Under these conditions, significative ultrastructural alterations of the protozoa were visualized through transmission electron microscopy. The toxicity of eupomatenoid-5 against macrophages cell cultures was observed at concentrations higher than the necessary to inhibit the protozoa growth. The effect of eupomatenoid-5 in the leishmania-macrophage interaction is higher when the parasites are treated before the interaction.

Keywords *Leishmania amazonensis*, *Piper regnellii*, antileishmanial activity, eupomatenoid-5, neolignan, medicinal plants, cytotoxicity, ultrastructure.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	21
1.2 LEISHMANIOSES.....	24
1.2.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>.....	26
1.2.2 Interação parasita-hospedeiro.....	27
1.2.3 Tratamento das leishmanioses.....	28
1.3 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	30
1.4 <i>Piper regnellii</i>	32
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 COLETA DA PLANTA.....	35
3.2 SECAGEM DA PLANTA.....	35
3.3 DADOS ESPECTROMÉTRICOS.....	36
3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	36
3.5 ISOLAMENTO DO EUPOMATENÓIDE-5.....	37
3.5.1 Preparação dos extratos brutos.....	37
3.5.2 Fracionamento do extrato bruto fase acetato 90%.....	40
3.5.3 Fracionamento da fração clorofórmio.....	43
3.6 MANUTENÇÃO DO PARASITA.....	44
3.7 CULTURA DE MACRÓFAGOS J774G8.....	45
3.8 SOLUÇÕES ESTOQUE DA DROGA.....	45

3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUPOMATENÓIDE-5 NO CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i>	46
3.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J774G8.....	47
3.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUPOMATENÓIDE-5 SOBRE INTERAÇÃO PARASITA-MACRÓFAGO.....	48
3.12 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE FORMAS PROMASTIGOTAS TRATADAS COM EUPOMATENÓIDE-5.....	49
3.13 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE FORMAS PROMASTIGOTAS TRATADAS COM EUPOMATENÓIDE-5.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 ESTUDO QUÍMICO.....	51
4.1.1 Determinação estrutural da substância isolada Eupomatenóide-5.....	51
4.1.2 Dados físicos e espectrométricos.....	58
4.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	59
4.2.1 Estudo do efeito dos extratos brutos, frações e substância pura no crescimento de <i>L. amazonensis</i>	59
4.2.2 Ensaio de citotoxicidade.....	62
4.2.3 Efeito do eupomatenóide-5 sobre interação parasita-macrófago.....	68
4.2.4 Alterações morfológicas de formas promastigotas tratadas com eupomatenóide-5.....	70
4.2.5 Alterações ultraestruturais de formas promastigotas tratadas com eupomatenóide-5.....	72

5	DISCUSSÃO.....	76
6	CONCLUSÕES.....	80
7	REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Aspecto das folhas da espécie vegetal <i>P. regnellii</i> var. <i>pallescens</i>	32
Figura 2 Cromatografia em camada delgada das frações F1-F5.....	42
Figura 3 Espectro de RMN ¹ H da substância FC-58-62.....	54
Figura 4 Espectro de RMN ¹³ C e DEPT 90° e 135° da substância FC-58-62.....	57
Figura 5 Porcentagem de inibição de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com extrato bruto fase aquosa (EBA) e fase acetato de etila (EBAcEt) em 72 horas de cultivo.....	59
Figura 6 Porcentagem de inibição de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com frações do extrato bruto fase acetato de etila em 72 horas de cultivo.....	60
Figura 7 Porcentagem de inibição de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com eupomatenóide-5 durante 96 h de cultivo.....	61
Figura 8 Porcentagem de inibição de formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com eupomatenóide-5 durante 96 h de cultivo.....	62

Figura 9 Porcentagem de macrófagos J774G8 viáveis após 48 horas de tratamento com eupomatenóide-5 e AMPB.....	65
Figura 10 Microscopia fotônica de macrófagos J774G8 tratados com eupomatenóide-5.....	66
Figura 11 Microscopia fotônica de macrófagos J774G8 tratados com AMPB.....	67
Figura 12 Ensaio de interação de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com macrófagos J774G8.....	69
Figura 13 Microscopia fotônica de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	71
Figura 14 Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> cultivadas na presença de 9 µg/ml de eupomatenóide-5.....	74
Figura 15 Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> cultivadas na presença de 25 µg/ml de eupomatenóide-5.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sistemas eluentes para coluna de fracionamento a vácuo do extrato bruto fase acetato 90% e suas respectivas frações obtidas.....	40
Tabela 2 Sistemas eluentes para CC da fração clorofórmio e suas frações obtidas.....	43
Tabela 3 Dados de RMN ¹ H (300 MHz) em CDCl ₃ da FC-58-62, comparados com os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio para o eupomatenóide-5 (300 MHz) em CDCl ₃ , descritos na literatura (CHAURET et al., 1996)*.....	53
Tabela 4 Dados de RMN ¹³ C e DEPT (75,5 MHz) em CDCl ₃ da FC-58-62, comparados com os valores do eupomatenóide-5 (75,5 MHz) em CDCl ₃ , descritos na literatura (CHAURET et al., 1996)*.....	56
Tabela 5 Comparação dos valores de CC ₅₀ para macrófagos J774G8 e IC ₅₀ para formas promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> e seus respectivos índices de seletividade (IS).....	63
Tabela 6 Valor da CC ₅₀ (µg/ml) para macrófagos J774G8, CI ₅₀ (µg/ml) para promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e o valor do índice de seletividade (IS).....	64
Tabela 7 Porcentagem de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com morfologia alterada após tratamento com eupomatenóide-5.....	70

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 Procedimento para obtenção do extrato hidroetanólico 90% (fase aquosa e fase acetato) das folhas de *P. regnellii* var. *pallescens*.....39

Fluxograma 2 Procedimento para isolamento e purificação dos constituintes do extrato bruto fase acetato 90%.....41

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABREVIATURAS

AMPB	Anfotericina B
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CI ₉₀	Concentração Inibitória de 90%
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL ₅₀	Dose Letal de 50%
DL ₉₀	Dose Letal de 90%
DMSO	Dimetilsulfóxido
ES/EM	Eletrospray acoplado a Espectrometria de Massas
h	Horas
IE/EM	Impacto Eletrônico/ Espectrometria de Massas
IV	Infravermelho
p.a.	Para análise
PBS	Tampão Fosfato Salina
PM	Peso Molecular
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico em ppm
d	dubleto
dd	duplo dubleto
dq	duplo quarteto
J	Constante de acoplamento
m/z	razão massa carga
M+	Pico do íon molecular
s	singlete

UNIDADES

cm	centímetro
g	grama
Hz	Hertz
μg	micrograma
MHz	Megahertz
ml	mililitro
μl	microlitro
μm	micrômetro

Dedico este trabalho

A minha família, em especial aos meus pais,
Euclenio e Maria Emilia (*in memoriam*),
pelo amor, atenção, paciência e incentivo constante
em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

“Todavia para nós há um só Deus, o Pai, de quem é tudo e para quem nós vivemos; e um só Senhor, Jesus Cristo, pelo qual são todas as coisas, e nós por ele”.

Coríntios (8;6)

A todos que me incentivaram e acreditaram em mim, os meus sinceros agradecimentos, pois é sabido que é impossível realizar algo sozinho. Reconheço o carinho, a atenção e o incentivo das pessoas que realmente estiveram ao meu lado.

A professora Dr^a. Tânia Ueda Nakamura pela valiosa orientação, amizade e apoio em todas as fases de execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Celso Vataru Nakamura pelas sugestões valiosas para o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez, pela colaboração no desenvolvimento da parte fitoquímica do trabalho.

Aos professores, Dr. Benedito Prado Dias Filho e Dr. Benicio Alves de Abreu Filho, pelos sábios conselhos.

Ao Dr. José Andrés Morgado-Díaz pelo auxílio nos trabalhos de microscopia eletrônica, pela amizade e gentileza dele e de sua equipe ao me receber no laboratório de pesquisa no Instituto Nacional do Câncer.

Às amigas de pós-graduação Cecília Valente Rodrigues Truite e Raíssa Bocchi Pedroso pelo adorável convívio, amizade, companheirismo e incentivo nos dias de desânimo.

Aos companheiros de mestrado Ivens Camargo Filho, Adriana Valente Teixeira Volpe, Kelly Ishida, Andréa Mayumi Koroishi, Denise de Oliveira Scoaris, Marie Eliza Zamberlan, Mislaine Adriana Brenzan, Nilza de Lucas Rodrigues Bittencourt, Simone Evellyn Daniel Hernandes, Eliana Harue Endo, Thelma Onozato, Jean Colacite, Daniel Rodrigues Silva, por termos compartilhado momento ímpar em nossas vidas com harmonia.

Aos alunos de iniciação científica Adriana dos Santos, Paloma Korehisa Maza, Patrícia Mayumi Honda, Amanda Bortoluci da Silva, Heloisa Bressan Gonçalves, Aline Rasmussen Fachim, Jéssica Bertol, Simone Foss, Karin Juliane Pelizzaro Rocha, Érika Ravazzi Franco Ramos, Paula Galdino de Carvalho, Vanessa Yumi Ido e Rafael Eidi Yamamoto, pela amizade, ajuda e momentos maravilhosos de descontração.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Básica: Marinete Martinez Vicentim, Márcio Guilhermetti, Zelita Rodrigues de Souza, Prisciliana Maria da Silva Carvalho, Maria Aparecida Ferreira Manzotti, Rosana Ferreira Carli e Adriana Rossetto Barriviera, pela paciência, apoio técnico e companheirismo.

Ao técnico do laboratório de Farmacognosia, Admir pelo auxílio na obtenção dos extratos e frações da planta.

À técnica do Departamento de Química, Ivania, pela ajuda na obtenção dos espectros de RMN.

A todos da minha família, principalmente meus pais e irmãos Suzie e Junior, que com amor, torceram por mim e acreditaram na minha capacidade.

Aos meus queridos professores Eliane e Sidnei que sempre me auxiliaram, acreditaram e torceram por mim.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas desta Universidade e ao corpo técnico/administrativo pela oportunidade de realização deste trabalho, apoio e serviços prestados, em especial a Helena e Sônia secretárias Departamento de Farmácia e Farmacologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

“Somente uma mente fraca procura por
respostas definitivas”.

Murilo Ganesh.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Análises Clínicas, no laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá e na Divisão de Biologia Celular, Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais têm sido utilizadas desde tempos antigos como medicamentos para o tratamento de várias doenças (SCHENKEL et al., 2003).

Após séculos de uso empírico de preparações a base de ervas, o primeiro isolamento de princípios ativos, no começo do século XIX, marcou a nova era da pesquisa moderna envolvendo plantas medicinais (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). A descoberta da atividade biológica dessas substâncias deu origem a uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SCHENKEL et al., 2003).

Com a chegada do século XX, o interesse por drogas derivadas de plantas aumentou expressivamente apesar de toda tecnologia dos medicamentos sintéticos. A busca por novos princípios ativos isolados de plantas e o interesse nos estudos de compostos naturais ativos como modelo para síntese de substâncias análogas mais potentes e seletivas, que podem ser obtidas relativamente com maior facilidade e talvez a custos menores, motiva as companhias farmacêuticas a investigarem plantas como fontes de novas estruturas e também para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados que mostrem eficácia, segurança e qualidade (BREVOORT, 1995; DE SMET, 1997; BLUMENTHAL, 1999).

Cerca de 25% das drogas prescritas em todo o mundo tem origem de plantas. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% possuem origem exclusivamente de plantas e um número significativo de drogas sintéticas é obtido de precursores naturais (RATES, 2001). De acordo com a Organização

Mundial da Saúde (OMS), devido à pobreza e dificuldade ao acesso à medicina moderna, 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para os cuidados primários com a saúde (AKERELE, 1993).

Apesar da grande utilização de plantas na medicina popular, para a grande maioria dos fitoterápicos comercializados faltam evidências laboratoriais comprobatórias de eficácia e segurança, sendo que seus supostos méritos terapêuticos devem-se principalmente a informações empíricas e subjetivas da medicina folclórica (BRAGANÇA, 1996). Sendo promovidos como naturais e, portanto, inofensivos, estes produtos não são absolutamente livres de efeitos adversos (EDZARD, 1998). É importante apontar que 11,1% das plantas estudadas têm sido relatadas como tendo efeitos tóxicos. Esta consideração aumenta a preocupação sobre o uso popular e o abuso no emprego de plantas no tratamento de diversas doenças (BRITO; BRITO, 1993).

Uma avaliação científica das plantas medicinais utilizadas tradicionalmente forneceu para a medicina moderna, drogas efetivas para o tratamento de doenças parasitárias. Três das maiores classes de drogas anti-protozoárias possuem origem de plantas. Dentre elas estão a quinina, isolada da *Cinchona succirubra*, que foi a primeira droga antimalárica descoberta; a emetina, uma droga amebicida obtida da *Cephaelis ipecacuanha* e o endoperoxídeo sesquiterpeno artemisim, isolado da *Artemisia annua*, com atividade anti-malárica (IWU et al., 1994).

Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existentes no planeta, sendo a maioria desconhecida sob o ponto de vista científico. Menos de 10%, das aproximadamente 250 mil espécies existentes, têm sido investigadas cientificamente por suas propriedades farmacológicas (ANTHONY et al, 2005).

As plantas medicinais estão distribuídas mundialmente, mas existe em maior abundância nos países tropicais. A floresta Amazônica é um extenso e heterogêneo território

que contém um grande número de espécies ainda não descritas (SCHULTES, 1979; GENTRY, 1982) e várias tribos indígenas com ampla experiência com plantas medicinais.

A procura por agentes antimicrobianos é ainda um desafio enfrentado por muitos laboratórios de fitoquímica. Contudo, prioridades têm de ser dadas para infecções tropicais e doenças crônicas, onde as medicações atuais provocam sérias inconveniências e o estudo dos remédios à base de ervas pode levar ao desenvolvimento de drogas mais seguras, de menor custo e menos tóxicas do que os medicamentos existentes (EDITORIAL, 1994).

Espécies da família Compositae (Asteraceae) e Leguminosae são as mais estudadas no Brasil. Algumas vezes a investigação biológica é realizada somente com a planta no seu estado bruto, sem pesquisas adicionais na atividade de diferentes extratos ou mesmo na tentativa do isolamento dos compostos ativos. A cada dia, um número cada vez maior de grupos de pesquisadores brasileiros está se conscientizando e se interessando em pesquisas com plantas medicinais. Além disso, em muitos estados brasileiros, alguns projetos governamentais estão introduzindo o uso de fitoterápicos nos serviços de saúde pública, o que mostra o valor da medicina popular (BRITO; BRITO, 1993).

O panorama da fitoquímica é muito importante e decisivo para o Brasil, num futuro próximo, ao considerar sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades que se observam para o desenvolvimento de novos medicamentos. Analisando todas as fases do desenvolvimento da química de plantas medicinais, pode-se evidenciar sua importância, não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas como fonte de novos e potentes fármacos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

1.2 LEISHMANIOSES

Atualmente, as leishmanioses são prevalentes em quatro continentes (americano, africano, asiático e europeu), sendo que 88 países são considerados zonas endêmicas e destes, 72 são países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001 a). Dos casos de leishmaniose cutânea, 90% ocorrem em 7 países: Afeganistão, Paquistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Brasil. A maioria dos casos de leishmaniose visceral (90%) ocorrem em áreas rurais e suburbanas de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Brasil e Sudão. Estima-se que a incidência de leishmaniose cutânea seja de 1 a 1,5 milhões de casos por ano. Para leishmaniose visceral, o número estimado é de 500 mil casos ano, sendo que as leishmanioses estão associadas com aproximadamente 70.000 mortes por ano (MURRAY et al., 2005)

Segundo Desjeux (2004) há uma grande diferença entre o número de casos ocorrentes e o número de casos registrados. Como a declaração é obrigatória somente em 32 dos 88 países afetados por leishmanioses, um número significativo de casos nunca é registrado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001 b).

A leishmaniose tegumentar é uma doença endêmica em vários Estados do Brasil com número crescente de notificações, atingindo 490.606 casos confirmados no período de 1980 e 2001. As regiões norte e nordeste são as que apresentam o maior número de casos, com 73,6% desta totalidade. Neste mesmo período, o Estado do Paraná confirmou 10.345 casos da doença, cerca de 2,1% da incidência brasileira (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

A doença pode manifestar-se de várias maneiras dependendo da espécie do parasita que está causando a infecção e do sistema imunológico do hospedeiro. As formas clínicas da doença podem ser divididas em dois grupos principais: a forma tegumentar e a forma visceral.

A forma tegumentar pode ser subdividida em leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa e cutaneomucosa. A leishmaniose cutânea localizada afeta principalmente locais mais propícios para a picada do inseto como o rosto, nariz, braços e pernas. É causada por parasitas dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*. No local da picada, forma-se uma pápula que evolui para a formação de um nódulo. As lesões ulcerosas indolores podem ser rasas ou profundas com bordos elevados, e podem progredir espontaneamente para a cura após 6 a 12 meses (GREVELINK; LERNER, 1996).

A leishmaniose cutânea difusa ocorre em indivíduos imunodeprimidos infectados por espécies como *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. pifanoi* (DESJEUX, 2004). A doença tem início com uma lesão primária no local da picada e se dissemina pelo corpo por via hematogênica ou linfática, levando ao aparecimento de nódulos não ulcerativos espalhados por todo o corpo. Nesta forma da doença, as lesões são ricas em parasitas (GREVELINK; LERNER, 1996).

A leishmaniose cutaneomucosa é comumente causada pela espécie *L. braziliensis*. Os pacientes podem apresentar as lesões cutaneomucosas dentro de 2 a 10 anos após o aparecimento da lesão cutânea. As lesões ocorrem devido à disseminação por via hematogênica ou linfática que afetam regiões nasofaríngeas. Pode ocorrer mutilação do septo nasal, palato, faringe, gengivas e lábios. A invasão do trato respiratório pode resultar em comprometimento da respiração e da deglutição, que pode levar o paciente ao óbito (GREVELINK; LERNER, 1996).

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica causada pela disseminação do protozoário por todo sistema fagocítico mononuclear e é caracterizada por febre,

hepatoesplenomegalia, pancitopenia, linfadenopatia, emagrecimento e estado de debilidade progressivo, levando o paciente ao óbito se não for submetido ao tratamento específico. Pode ser causada por *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi* (BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999).

1.2.1 Ciclo de vida de *Leishmania*

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários unicelulares, heteroxênicos, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Foram descritas cerca de 30 espécies de *Leishmania* podendo ser agrupadas em dois subgêneros: Viannia, que compreende apenas o complexo *Leishmania braziliensis*; *Leishmania*, constituído pelos complexos *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana* (CUPOLILLO et al., 2000).

A espécie *L. amazonensis*, pertence ao subgênero *Leishmania* e ao complexo *Leishmania mexicana* e é responsável principalmente pela forma tegumentar da doença (GENARO, 1995) podendo também causar a leishmaniose visceral (HERWALDT, 1999). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos (roedores, marsupiais, canídeos e primatas) e os invertebrados são os insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomya* (GENARO, 1995).

No trato digestivo dos hospedeiros invertebrados é encontrada a forma flagelada promastigota e no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, a forma amastigota que apresenta um curto flagelo (MICHALICK, 1995).

A doença pode ser transmitida por insetos dos gêneros *Lutzomya*, *Phlebotomus* e *Psychodopygus* de acordo com a espécie do protozoário (GREVELINK; LERNER, 1996). Os

hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, são infectados quando as formas promastigotas infectantes são inoculadas pelas fêmeas dos vetores, durante o repasto sangüíneo, onde a saliva do inseto parece exercer um papel importante por conter substâncias vasodilatadoras que aumentam o fluxo de células sangüíneas para o local da picada. As formas promastigotas são então fagocitadas pelos macrófagos teciduais e se transformam rapidamente em formas arredondadas sem flagelo aparente, amastigotas. Os protozoários estabelecem-se no fagolisossomo dos macrófagos e resistindo a ação destruidora das enzimas lisossomais, multiplicam-se por divisão binária ocupando um compartimento denominado de vacúolo parasitóforo. A membrana do macrófago rompe-se liberando as formas amastigotas no tecido que são novamente fagocitadas por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre no momento do repasto sangüíneo em indivíduo ou animal infectado, onde o inseto adquire as formas amastigotas que se transformam em promastigotas no intestino do inseto, completando o ciclo biológico (MICHALICK, 1995; GREVELINK; LERNER, 1996).

1.2.2 Interação parasita-hospedeiro

As leishmânias estabelecem com o hospedeiro vertebrado uma interação parasita-hospedeiro complexa. A resposta imune antileishmania parece ser um processo dependente do genótipo do hospedeiro, pois estudos comprovaram que algumas espécies de camundongos são susceptíveis a doença enquanto outras são resistentes (ROBERTS et al., 1997). Sabe-se que formas promastigotas de *Leishmania* ligam-se a algumas moléculas presentes na superfície dos macrófagos, como receptores de complemento, facilitando sua internalização,

além disso, glicoproteínas presentes na superfície do parasita aumentam sua virulência. Lipofosfoglicana (LPG) é uma das moléculas presentes em abundância na superfície de formas promastigotas de *Leishmania* importante na fase de estabelecimento do parasita no interior do macrófago. A LPG inibe o estresse oxidativo, um processo natural que ocorre após a fagocitose e também a atividade hidrolítica das enzimas lisossomais (AWASTHI et al., 2004).

Os macrófagos, quando ativados por produtos microbianos e virais (proteínas, lipídeos, polissacarídeos), imuno-complexos e vários antibióticos, produzem entre outras moléculas o óxido nítrico (NO), molécula derivada a partir do aminoácido L-arginina com funções antitumoral e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* (NATHAN, 1992). A via do óxido nítrico é regulada enzimaticamente pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

A via de produção do NO pode estar envolvida na morte de determinados parasitas. Muitos patógenos dependem da arginina exógena para sua proliferação, portanto, a depleção da arginina pela ativação da iNOS em macrófagos pode levar a morte do mesmo (OLDS et al., 1980; PIACENZA et al., 2001). Outro possível mecanismo sugere que *N*^ω-hidroxi-L-arginina, produto intermediário da via L-arginina-iNOS-NO, contribui para a morte da forma intracelular da leishmânia de modo NO-independente (INIESTA et al., 2001).

1.2.3 Tratamento das leishmanioses

Os principais medicamentos recomendados para o tratamento das leishmanioses cutâneas e viscerais são os derivados dos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), que foram introduzidos na terapêutica há mais de meio século (CROFT; COOMBS, 2003). Entretanto, os antimoniais

estão longe de serem as drogas ideais, pois não são ativos quando administrados oralmente e necessitam de um longo período de tratamento (CROFT, 1988). Além disso, os efeitos tóxicos, incluindo mialgias, pancreatite, anemia e leucopenia podem revelar a intolerância desses medicamentos por muitos pacientes. Os antimoniais pentavalentes interferem na produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, comprometendo toda a atividade da célula (BERMAN, 1988).

Uma segunda linha de compostos usados no tratamento dos casos que não respondem a terapia convencional incluem pentamidinas (GENARO, 1995; GREVELINK; LERNER, 1996) e anfotericina B (SERENO et al., 2000). As pentamidinas se ligam ao DNA do cinetoplasto do parasita causando danos ao protozoário (CROFT; COOMBS, 2003). Esta droga também é responsável por diversos efeitos colaterais. O principal sítio de ação da anfotericina B em promastigotas de *Leishmania* parece ser os esteróis de membrana, de modo que esta ligação resulta na perda da permeabilidade celular (SAHA et al., 1986; COHEN, 1998).

As drogas de administração oral têm sido estudadas para o tratamento das leishmanioses. Antifúngicos derivados do imidazol e triazol, como o cetoconazol e itraconazol, que bloqueiam a síntese do ergosterol, também têm se mostrado efetivos contra algumas espécies de *Leishmania* (BERMAN et al., 1984; VANNIER-SANTOS et al., 1995). Análogos lisofosfolipídicos como a eldefosina, ilmofosina e miltefosina têm sido estudados como agentes quimioterápicos no tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos (DE CASTRO et al; 2004). Resultados clínicos sugerem que a miltefosina é a primeira droga de via oral efetiva e segura em casos de leishmaniose cutânea e visceral (FISCHER et al; 2001). Os principais efeitos colaterais observados nesses resultados foram relacionados ao trato gastrointestinal.

Devido ao aumento da incidência de casos de leishmanioses, existe uma grande procura por novas terapias que substituam as atuais, ou seja, com menor duração de tratamento, drogas não parenterais, menos tóxicas e mais efetivas (BERMAN, 1997).

1.3 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Os produtos naturais apresentam um grande potencial para a descoberta de novos agentes seletivos para o tratamento de doenças tropicais importantes causadas por protozoários. Alcalóides, terpenos, flavonóides e quinonas são exemplos que ilustram a diversidade de compostos encontrados em plantas que podem apresentar atividade seletiva em relação ao parasita. Portanto, podem ser objetos de estudo para a identificação de novas drogas e para modificações semi-sintéticas para melhorar a atividade terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos do composto (WRIGHT; PHILLIPSON, 1990).

Fournet et al., em 1992, realizaram um estudo com a planta boliviana *Pera benensis* utilizada na medicina popular para o tratamento de leishmanioses cutâneas. Três substâncias conhecidas como naftoquinonas foram isoladas e identificadas como 3,3'-biplumbagina, 8,8'-biplumbagina e plumbagina e que apresentaram efeito contra *Leishmania brasiliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani*.

Em 1998, Araújo et al. isolaram um isoflavonóide (7,3'-diidróxi-4'-metóxi-isoflavona) e dois diarileptanoides (2[β -(p-hidroxifenil)-etil]-6-(p-hidroxifenil) tetrahidropirano e 3-hidróxi-1,7-bis-(4',4''-dihidroxifenil)-heptano das cascas de *Centrolobium sclerophyllum* que apresentaram IC₅₀ de 140 nM, 77 nM e 86 nM, respectivamente, contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Modificação estrutural a partir de moléculas isoladas de plantas também tem sido utilizada para avaliar a atividade antileishmania. Araújo et al. (1999) evidenciaram este fato, realizando modificações estruturais na molécula de curcumina, derivado de *Curcuma longa*. O composto com maior atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* foi o derivado metilcurcumina com $IC_{90}=35\mu M$. Este composto também reduziu em 65,5% o tamanho da lesão *in vivo*.

O óleo essencial das folhas de *Croton cajucara* apresentou excelente atividade na inibição do crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Alterações morfológicas como destruição da cromatina nuclear e do cinetoplasto foram observadas quando formas promastigotas foram tratadas com 15 ng/ml do óleo. O linalol, um álcool terpênico, é o constituinte principal do óleo, tendo maior atividade leishmanicida do que o óleo essencial (ROSA et al., 2003).

Tiuman et al. (2005) isolaram de partes aéreas de *Tanacetum parthenium* uma lactona sesquiterpênica denominada partenolideo. Esta substância quando aplicada sobre formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro* apresentou IC_{50} de 0,37 $\mu g/ml$ e DL_{90} de 1 $\mu g/ml$. Intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar foi observada através de microscopia eletrônica de transmissão.

Com os estudos citados acima, pode-se afirmar que plantas medicinais possuem características que as tornam possíveis fontes de moléculas químicas e protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra as leishmanioses.

1.4 *Piper regnellii*

A família Piperaceae pertence à classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, subordem Nymphaeiflorae e ordem Piperales (MACRAE; TOWERS, 1984; SANTOS et al., 2001), sendo pantropical com espécies distribuídas pelas Américas (FIGUEIREDO; SAZIMA, 2000). O gênero *Piper* inclui um grande número de espécies popularmente conhecidas como caapeba, capeba ou pariparoba (PARIPAROBA, 1984). Algumas espécies são utilizadas na medicina popular como antiblenorrágicas, desobstruentes, diuréticas, emolientes e em casos de pleurite (BALBACH, 1974). São também utilizadas na produção de óleos essenciais de interesse nas indústrias farmacêuticas e de inseticidas (MAIA et al., 1987).

Várias substâncias fisiologicamente ativas têm sido isoladas de espécies de Piperaceae podendo ser destacadas as amidas, os alcalóides, as lignanas, as neolignanas, os terpenos, os esteróides, as chalconas, e os flavonóides (SENGUPTA et al., 1987; PARMAR et al., 1997; SANTOS et al., 2001). *Piper regnellii* var. *pallescens* é uma planta arbustiforme de 1m de altura com folhas alternadas, grandes, com limbo cordiforme, 18cm de comprimento; pecíolo de 2,5 – 5,5 cm de comprimento, nervuras pubescentes; inflorescência em amentos opostos aos pecíolos, solitários, menores que as folhas, com pedúnculo pubescente, de cerca de 2 cm de comprimento. Floresce em agosto (PARIPAROBA, 1984).



Figura 1: Aspecto das folhas da espécie vegetal *P. regnellii* var. *pallescens*

Estudos fitoquímicos da raiz de *P. regnellii* mostraram um acúmulo de vários fenilpropanóides e neolignananas dihidrobenzofurânicas incluindo conocarpano como o composto majoritário (BENEVIDES et al., 1999). O óleo essencial da *P. regnellii* foi analisado por Costantin et al. (2001). Os constituintes majoritários encontrados foram a mircena (52,60%) e o linalol (15,89%) e apresentaram atividade inibitória do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Holetz et al. (2002) mostraram que a *P. regnellii* var. *pallescens* apresenta atividade contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* e contra os fungos *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Pessini (2003) isolou pela primeira vez, a partir da var. *pallescens*, quatro neolignananas dihidrobenzofurânicas: conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6, já descritas na literatura para a espécie vegetal *P. regnellii* var. *regnellii*.

O resultado de uma triagem envolvendo 19 extratos de plantas medicinais na concentração de 100 µg/ml indicou que após 72 h de incubação, 5 extratos, entre eles o da *Piper regnellii*, promoveram uma inibição superior a 90% no crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (LUIZE et al., 2005). Outro estudo realizado por Luize (2004) demonstrou que a substância isolada desta planta, o eupomatenóide-5, possui atividade tripanocida.

Considerando que as plantas medicinais constituem uma fonte de compostos orgânicos com propriedades biológicas e que substâncias isoladas de *Piper regnellii* estão associadas a várias atividades biológicas, a substância eupomatenóide-5 foi selecionada neste trabalho para avaliar a atividade contra *Leishmania amazonensis*.

2 OBJETIVOS

- a) Avaliar o efeito do eupomatenóide-5, isolado das folhas de *P. regnellii* var. *pallescens*, no crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* *in vitro*.
- b) Realizar ensaios de citotoxicidade, utilizando o eupomatenóide-5 em macrófagos J774G8, através do método colorimétrico da sulforodamina B.
- c) Analisar o efeito do eupomatenóide-5 na interação de *L. amazonensis* com macrófagos J774G8.
- d) Analisar as alterações morfológicas e estruturais das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com eupomatenóide-5 utilizando técnica de microscopia fotônica comum e eletrônica de transmissão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DA PLANTA

As folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais Prof^a Irenice Silva do campus da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A espécie vegetal foi identificada por MSc. Marília Borgo, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e uma exsicata foi depositada como documento taxonômico no Herbário da UEM, sob número de registro HUM 8392.

3.2 SECAGEM DA PLANTA

O material coletado foi seco em estufa de ar circulante (QUIMIS[®], modelo Q-31) a temperatura de 40°C, durante 72 horas e moído em moinho de facas TECNAL MARCONI (Modelo TE 048), acondicionado e armazenado em local seco e ao abrigo da luz.

3.3 DADOS ESPECTROMÉTRICOS

As análises por ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB, 300 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C . Foi utilizado o solvente clorofórmio deuterado, e como referência interna o TMS ($\delta=0,0$ ppm).

3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Na preparação por coluna cromatográfica (CC) de adsorção, foi utilizada coluna de vidro com 3,0 cm de diâmetro e 35,0 cm de comprimento acoplada a Kitassato e este conectado a uma bomba de vácuo.

Como fase estacionária, foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM MERCK[®]) e como fase móvel foram desenvolvidos vários sistemas eluentes p. a. (Synth), com solventes puros ou misturas de dois solventes, variando a proporção entre os mesmos. As frações foram eluídas em CC pelos solventes em ordem crescente de polaridade. Em seguida foram concentradas em aparelho evaporador rotatório (modelo: R-114 – BÜCHI) à pressão reduzida com temperatura de 40 °C até completa eliminação do solvente. As sub-frações foram coletadas em tubos de ensaio e os solventes foram secos a temperatura ambiente.

Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas de vidro de 5 x 10 cm preparadas com uma espessura de 0,5 mm de sílica gel GF₂₅₄, ativadas

à 105-110 °C por 30 minutos. Como fase móvel foram utilizados solventes puros ou misturas binárias de polaridades diferentes.

A visualização das substâncias nas placas de CCD foi feita pela revelação em vanilina sulfúrica (2%).

3.5 ISOLAMENTO DO EUPOMATENÓIDE-5

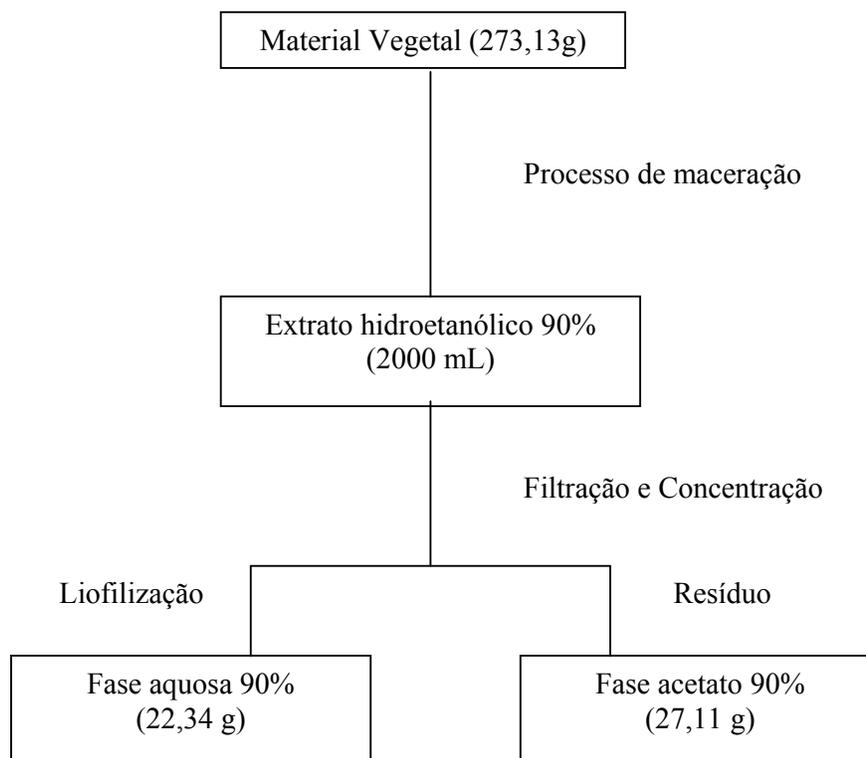
3.5.1 Preparação dos extratos brutos

As folhas secas e moídas (273,13 g) foram submetidas a extração, na proporção 1:10 (material vegetal:solvente) pelo processo de maceração durante 5 dias à temperatura ambiente (PRISTA, et al., 1975) com soluções hidroetanólicas preparadas à 90% (v/v).

Os extratos foram filtrados e concentrados à pressão reduzida em evaporador rotatório, a temperatura de 40°C. Após a eliminação do solvente foi adicionada água destilada, sendo a parte solúvel em água denominado de extrato bruto fase aquosa, que foi posteriormente congelado em nitrogênio líquido e liofilizado (liofilizador – modelo: 1-2 CHRIST ALPHA). O liofilizado foi acondicionado em frasco plástico hermeticamente fechado e mantido em freezer.

A parte do extrato insolúvel em água (resíduo) foi solubilizada em acetato de etila e denominado de extrato bruto fase acetato, evaporado a temperatura ambiente, armazenado em frascos de vidro e mantido em freezer (Fluxograma 1). O processo de maceração foi repetido por 5 vezes até completa extração.

O extrato bruto fase acetato 90% foi analisado por CCD, eluída na fase móvel hexano: acetato de etila (7:3, v/v) e reveladas com solução de vanilina sulfúrica (2%).



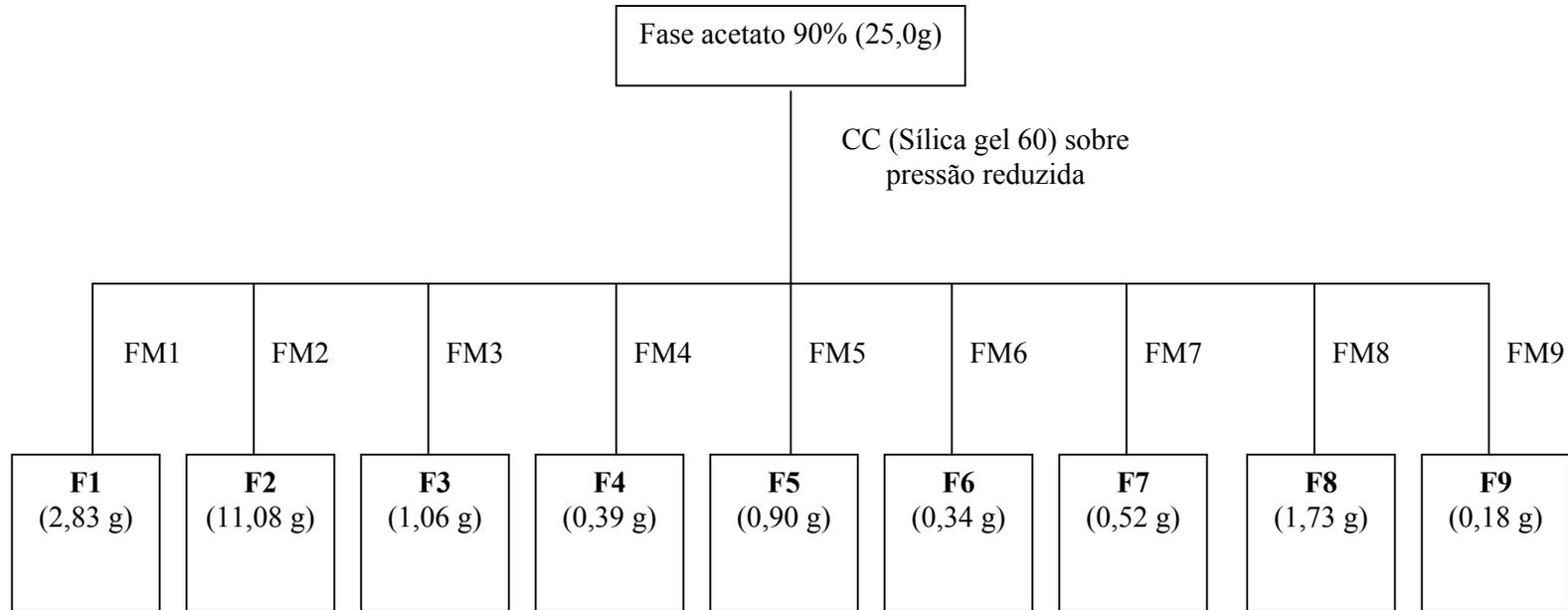
Fluxograma 1: Procedimento para obtenção do extrato hidroetanólico 90% (fase aquosa e fase acetato) das folhas de *P. regnellii* var. *pallescens*.

3.5.2 Fracionamento do extrato bruto fase acetato 90%

A fase acetato 90% foi fracionada por Cromatografia em Coluna (CC) de adsorção à pressão reduzida (Fluxograma 2). Foram triturados 25g do extrato bruto fase acetato 90% em almofariz, com sílica gel 60 (70-230 mesh), sendo esta mistura empacotada em coluna de 3,0 x 35,0 cm, com hexano. A coluna foi eluída como apresentado na Tabela 1. As frações foram concentradas em evaporador rotatório, sendo as solúveis em água liofilizadas e as insolúveis evaporadas a temperatura ambiente, pesadas e mantidas a -20°C . As 9 frações obtidas foram analisadas por CCD após revelação com solução de vanilina sulfúrica (2%) (Figura 2).

Tabela 1: Sistemas eluentes para coluna de fracionamento a vácuo do extrato bruto fase acetato 90% e suas respectivas frações obtidas.

Sistema Eluente	Proporção	Quantidade utilizada (ml)	Fração
Hexano		1.470	F1 = Hexano
Clorofórmio		1.000	F2 = Clorofórmio
Clorofórmio: Acetato de Etila	(95:5)	500	F3 = Clorofórmio: Acetato de Etila (95:5)
Clorofórmio: Acetato de Etila	(90:10)	500	F4 = Clorofórmio: Acetato de Etila (90:10)
Clorofórmio: Acetato de Etila	(50:50)	500	F5 = Clorofórmio: Acetato de Etila (50:50)
Acetato de Etila		500	F6 = Acetato de Etila
Acetona		500	F7 = Acetona
Metanol		500	F8 = Metanol
Metanol: Água	(90:10)	500	F9 = Metanol: Água (90:10)



Fase Móvel da CC: **FM1** = Hexano; **FM2** = Clorofórmio; **FM3** = Clorofórmio:Acetato de etila (95:5); **FM4** = Clorofórmio:Acetato de etila (90:10); **FM5** = Clorofórmio:Acetato de etila (50:50); **FM6** = Acetato de etila; **FM7** = Acetona; **FM8** = Metanol; **FM9** = Metanol:Água (90:10).

Fluxograma 2: Procedimento para isolamento e purificação dos constituintes do extrato bruto fase acetato 90%

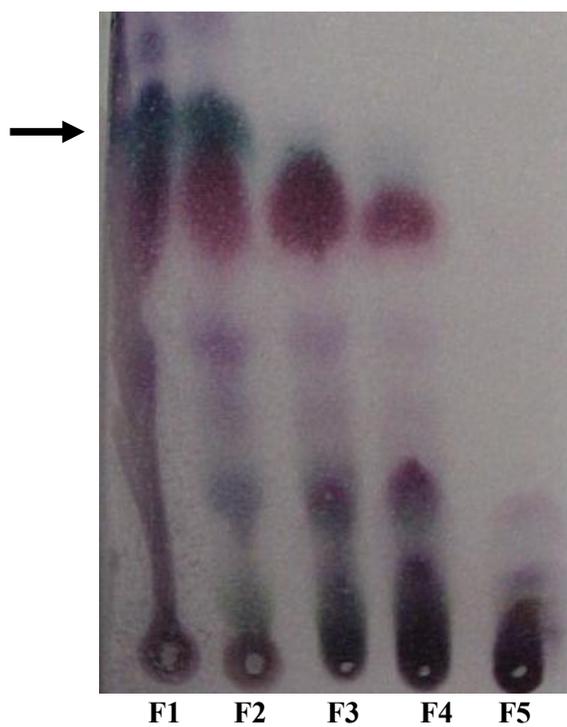


Figura 2: Cromatografia em camada delgada das frações F1 (hexano), F2 (clorofórmio), F3 (clorofórmio:acetato de etila 95:5), F4 (clorofórmio:acetato de etila 90:10) e F5 (clorofórmio:acetato de etila 50:50). A seta indica a posição relativa ao eupomatenóide-5.

3.5.3 Fracionamento da fração clorofórmio

Após realização da CCD, pode-se confirmar a presença de uma banda relativa ao eupomatenóide-5 em determinadas frações. A fração clorofórmio foi escolhida (9,0g) para a realização da cromatografia por apresentar um bom rendimento (Figura 2). A cromatografia foi realizada à pressão reduzida, em sílica gel 60 (70-230 mesh) em coluna de 3,0 x 35,0 cm, empacotada com hexano. A coluna foi eluída como apresentado na Tabela 2.

Foram obtidas 108 frações, analisadas em CCD e visualizadas após revelação com vanilina sulfúrica (2%). As frações que apresentaram semelhanças cromatográficas foram reunidas, novamente cromatografadas e em seguida evaporadas a temperatura ambiente. As frações denominadas FC-1 à FC-108 foram mantidas a -20°C .

Tabela 2: Sistemas eluentes para CC da fração clorofórmio e suas frações obtidas.

Sistema Eluente	Proporção	Quantidade	
		Utilizada (ml)	Fração
Hexano		300	FC-01
Hexano:Diclorometano	(98:2)	300	FC-02 a FC-7
Hexano:Diclorometano	(95:5)	300	FC-08 a FC-21
Hexano:Diclorometano	(90:10)	300	FC-22 a FC-36
Hexano:Diclorometano	(80:20)	300	FC-37 a FC-50
Hexano:Diclorometano	(50:50)	300	FC-51 a FC-64
Diclorometano		300	FC-65 a FC-78
Acetato de Etila		300	FC-79 a FC-93
Metanol		300	FC-94 a FC-108

As frações de interesse foram FC-58, FC-59, FC-60, FC-61 e FC-62 reunidas e denominada FC-58-62 que foi posteriormente identificada pelas análises espectrométricas descritas na seção 3.3.

Todas as etapas de fracionamento, isolamento e identificação da substância foram realizadas no laboratório de Farmacognosia do DFF/UEM.

3.6 MANUTENÇÃO DO PARASITA

Para o estudo foi utilizada a cepa de *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa), originalmente isolada pelo Dr. César A. C. Cuba (Universidade Federal de Brasília, Distrito Federal, DF, Brasil) de paciente com leishmaniose cutânea difusa.

As formas promastigotas foram cultivadas e mantidas em frascos estéreis e descartáveis para cultura de células de 25 cm² contendo meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco[®]” acrescido de hemina e ácido fólico) pH 7,0 e esterilizado por autoclavação a 121°C por 15 minutos. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®]), inativado a 56°C por 30 minutos, e as culturas mantidas em estufa BOD (FANEM modelo 347F) a 28°C. Os protozoários foram submetidos a repiques semanais. Para os experimentos, foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento, ou seja, após 72 horas de incubação do subcultivo.

Formas amastigotas axênicas foram obtidas através da transformação de formas promastigotas. A diferenciação *in vitro* foi realizada através do aumento gradativo de temperatura e diminuição de pH. Formas promastigotas na fase logarítmica de crescimento

foram semeadas (5×10^6 células/ml) em meio de Warren pH 7,0 suplementado com 20% de SFB. Posteriormente os parasitas foram incubados durante 7 dias aumentando-se gradativamente a temperatura a cada 24 h (28 °C, 30 °C, 32 °C) e após transformação, mantidas através de subcultivos em meio de Schneider (Sigma®) contendo 20% de SFB, a 32°C em estufa BOD (UEDA-NAKAMURA et al., 2001).

3.7 CULTURA DE MACRÓFAGOS J774G8

Os macrófagos da linhagem contínua J774G8 foram mantidos em frascos de cultura de células de 25 cm² em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) pH 7,2, o qual previamente foi esterilizado por processo de filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por 30 minutos a 56 °C e as culturas foram mantidas em estufa (FISHER SCIENTIFIC) à temperatura de 37 °C e tensão de 5% de CO₂. O meio de cultura adicionado de soro fetal bovino foi substituído diariamente nas culturas de células.

3.8 SOLUÇÕES ESTOQUE DA DROGA

Foram preparadas soluções estoque do eupomatenóide-5 nas concentrações de 50 µg/ml, 500 µg/ml e 5.000 µg/ml. Para a obtenção da concentração de 5.000 µg/ml, foram pesados 2,5 mg da substância em tubo de microcentrífuga e neste foi adicionado 50 µl de

DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA[®]). Esta solução foi agitada vigorosamente em agitador Vortex[®] até dissolução completa da substância. Completou-se o volume de 500 µl com 450 µl de meio de cultura, obtendo-se assim uma solução da substância.

Para obter a concentração de 500 µg/ml, foi feita uma diluição do estoque de 5.000 µg/ml em meio de cultura na proporção 1:10, em tubo de microcentrífuga, atingindo volume final de 1.000 µl. A concentração de 50 µg/ml foi obtida através da diluição do estoque de 500 µg/ml em meio Warren na proporção 1:10, atingindo volume final de 1.000 µl.

3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUPOMATENÓIDE-5 NO CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito do eupomatenóide-5 sobre o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, várias concentrações (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml) desta substância foram adicionadas ao meio de cultura (Warren para promastigota e Shneider para amastigota) contendo $1,0 \times 10^6$ protozoários/ml na fase exponencial de crescimento.

Para estabelecer um parâmetro de comparação foi utilizado como controle a cultura dos protozoários sem adição da substância e um outro controle com a adição de DMSO cuja concentração não ultrapassou 0,5% (v/v). As culturas foram suplementadas com 10% e 20% de soro fetal bovino e incubadas a 28 °C e 32°C (para promastigotas e amastigotas respectivamente). Estes experimentos foram realizados em placa de 24 poços (TPP) e a mesma foi incubada por um período de até 96 horas. O crescimento foi avaliado diariamente,

através da diluição da cultura de protozoários em formalina 5% e contagem das células em hemocítômetro (câmara de Neubauer).

Estes experimentos foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

3.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J774G8

Para verificar a toxicidade do eupomatenóide-5, foram utilizados macrófagos de linhagem contínua J774G8. O experimento foi realizado em placa de 96 poços, onde foram adicionadas 5×10^4 células/poço e então incubadas com RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram mantidas a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ até a formação de uma monocamada confluyente de células (aproximadamente 24 horas).

O meio de cultura foi retirado e em seguida foram adicionados 100µl/poço da solução de eupomatenóide-5 em diferentes concentrações. Para estabelecer um parâmetro de comparação, foi utilizado como controle células tratadas com diferentes concentrações de Anfotericina B (Cristália[®]) e células acrescidas somente com RPMI-1640. A microplaca foi novamente incubada a 37°C com tensão de CO₂ por 48 horas. Após este período as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% a 4 °C por 1 hora. Em seguida foram lavadas com cuidado em água corrente. Após a secagem da placa foram adicionados 50 µl/poço do corante sulforrodamina B (0,4% p/v em ácido acético aquoso 1%). A cultura foi mantida a 4 °C por 30 minutos. Posteriormente, a placa foi lavada 4 vezes com ácido acético 1% e após foram adicionados 150 µl/poço de Tris base 10mM. A placa foi agitada por 15 minutos e em seguida foi feita a leitura em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) em 530nm.

3.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUPOMATENÓIDE-5 SOBRE INTERAÇÃO PARASITA-MACRÓFAGO

Para avaliar o efeito do eupomatenóide-5 na multiplicação dos protozoários em cultura de macrófagos J774G8, foram utilizadas as técnicas descritas por Vieira et al. (2002). Deste modo, $5,0 \times 10^5$ células J774G8 foram dispensadas sobre lamínulas de vidro redondas dispostas em cada poço da placa de 24 poços e deixadas por um período de 30 minutos em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas uma vez com RPMI-1640 estéril e incubadas durante 24 horas com RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As formas promastigotas de *L. amazonensis* e/ou os macrófagos foram tratados ou não com 1 µg/ml, 10 µg/ml e 25 µg/ml da substância, 20 minutos antes da interação. A cultura aderida de macrófagos e os parasitos livres foram lavados com meio de cultura estéril. A interação ocorreu a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 90 minutos. Macrófagos já infectados (24 horas de interação) também foram tratados com as concentrações citadas anteriormente. Uma proporção de 10 promastigotas para 1 macrófago foi utilizada para este experimento. Os controles consistiam somente de macrófagos, infectados ou não pelos parasitas, acrescidos de meio de cultura.

Após 90 minutos de interação, as lamínulas foram lavadas com RPMI-1640 estéril para retirar os parasitas que não penetraram nas células e fixadas com solução de Bouin por aproximadamente 12 horas. Posteriormente o excesso de fixador foi retirado, lavando-se as lamínulas com solução de etanol 70%, coradas com solução de Giemsa (1:20) durante 45 minutos e descoradas em seqüência de soluções contendo acetona pura, acetona:xilol (7:3),

acetona:xilol (5:5), acetona:xilol (3:7) e xilol (10 segundos cada) e montadas sobre lâmina de vidro com Entellan (MERCK®).

A observação de pelo menos 600 células foi realizada em microscópio fotônico comum. O índice de internalização foi estabelecido, multiplicando-se o percentual de células infectadas e o número médio de parasitas por célula.

3.12 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE FORMAS PROMASTIGOTAS TRATADAS COM EUPOMATENÓIDE-5

A concentração inibitória 50% (IC₅₀) e concentração inibitória 90% (IC₉₀) do eupomatenóide-5, foram adicionadas ao meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e $1,0 \times 10^6$ protozoários/ml. Para este estudo, parasitas não tratados foram utilizados como controle. Após o período de 24, 48, 72 e 96 horas, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas com pequena quantidade de meio de cultura e colocadas na forma de esfregaço em lâminas de vidro. Em seguida, os esfregaços foram fixados com metanol por 5 minutos e hidrolizados com solução de ácido clorídrico 5N por 5 minutos. Posteriormente, foram corados com a metodologia de Panótico Rápido (LABORCLIN) e visualizados em microscópio fotônico comum. Foram observadas pelo menos 200 células. As imagens foram processadas no Programa Motic Images Plus, versão 2.0 acoplado ao microscópio fotônico.

3.13 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE FORMAS PROMASTIGOTAS TRATADAS COM EUPOMATENÓIDE-5

Os parasitas controle e tratados com a IC₅₀ e IC₉₀ do eupomatenóide-5 foram processados para a microscopia eletrônica de transmissão. Cerca de $1,0 \times 10^6$ protozoários/ml tratados ou não com IC₅₀ e IC₉₀ foram cultivados durante 72 horas e então fixados à temperatura ambiente em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2). Após a fixação, os protozoários foram pós-fixados por 30 minutos em uma solução com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1M. Posteriormente foram lavados com tampão cacodilato, desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebido em resina Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo (REICHTER) coletados em grade de níquel (300 mesh) e então contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 (SOUZA, 1998). A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada na Divisão de Biologia Celular do Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

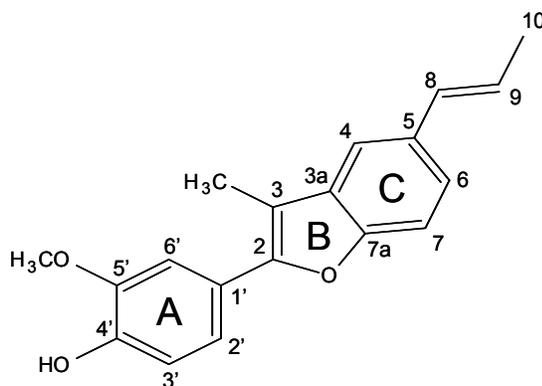
RESULTADOS

3.14 ESTUDO QUÍMICO

7.1.1 Determinação estrutural da substância isolada Eupomatenóide-5

A substância FC-58-62 (0,78 g) foi isolada da fração clorofórmio (Fluxograma 2).

As análises espectrais de RMN ^1H e ^{13}C comparadas com amostras autênticas do laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Maringá, auxiliaram na determinação da fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$ para a substância FC-58-62 demonstrada abaixo.



No espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) (Tabela 3, Figura 3) da FC-58-62 foram observados dois sinais de metila, uma em δ_{H} 2,4 (3H, *s*), outra em δ_{H} 1,89 (3H; *dd*; 6,6; 1,5

Hz) e uma metoxila em δ_{H} 3,94 (3H, *s*). Um sinal característico da hidroxila fenólica foi visualizado em δ_{H} 5,77 (1H, *s*). Foi observado o sinal de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 6,5 (1H; *dd*; 13,2; 1,8 Hz) e outro em δ_{H} 6,21 (1H; *dq*; 15,8; 6,6 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-9, respectivamente. A configuração E para o grupo propenil foi evidenciada pela presença de um sistema AMX3 [δ_{H} 6,5 (1H; *dd*; 13,2; 1,8 Hz), δ_{H} 6,21 (1H; *dq*; 15,8; 6,6 Hz), δ_{H} 1,89 (3H; *dd*; 6,6; 1,5 Hz)]. Os deslocamentos dos hidrogênios aromáticos foram observados em δ_{H} 7,26 (1H; *dd*; 8,1; 1,8 Hz); δ_{H} 7,00 (1H; *d*; 8,4 Hz); δ_{H} 7,41 (1H; *d*; 1,5 Hz); δ_{H} 7,27 (1H; *dd*; 8,6; 1,8 Hz); δ_{H} 7,30 (1H; *d*; 1,8 Hz); δ_{H} 7,35 (1H; *d*; 8,4 Hz), atribuídos aos H-2', H-3', H-4, H-6, H-6' e H-7, respectivamente. Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H obtidos para a substância FC-58-62 foram comparados com os valores de deslocamentos químicos encontrados na literatura para o eupomatenóide-5 (CHAURET et al., 1996), apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 da FC-58-62, comparados com os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio para o eupomatenóide-5 (300 MHz) em CDCl_3 , descritos na literatura (CHAURET et al., 1996)*.

H	FC-58-62 δ_{H}	Eupomatenóide-5 δ_{H}
2'	7,26 (<i>dd</i> ; 8,2; 1,8)	7,27 (<i>dd</i> ; 8,2; 1,9)
3'	7,00 (<i>d</i> ; 8,4)	7,00 (<i>d</i> ; 8,2)
4	7,41 (<i>d</i> ; 1,5)	7,42 (<i>d</i> ; 1,8)
6	7,27 (<i>dd</i> ; 8,6; 1,8)	7,26 (<i>dd</i> ; 8,6; 1,8)
6''	7,30 (<i>d</i> ; 1,8)	7,31 (<i>d</i> ; 1,9)
7	7,35 (<i>d</i> ; 8,4)	7,36 (<i>d</i> ; 8,6)
8	6,50 (<i>dd</i> ; 13,2; 1,8)	6,50 (<i>dd</i> ; 15,7; 1,7)
9	6,21 (<i>dq</i> ; 15,8; 6,6)	6,22 (<i>dq</i> ; 15,7; 6,5)
CH ₃ -3	2,40; <i>s</i>	2,41; <i>s</i>
CH ₃ -10	1,89 (<i>dd</i> ; 6,6; 1,7)	1,89 (<i>dd</i> ; 6,5; 1,7)
CH ₃ O-5'	3,94; <i>s</i>	3,97; <i>s</i>
OH	5,77; <i>s</i>	

*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{H}) e constantes de acoplamento (J, entre parênteses) em Hz.

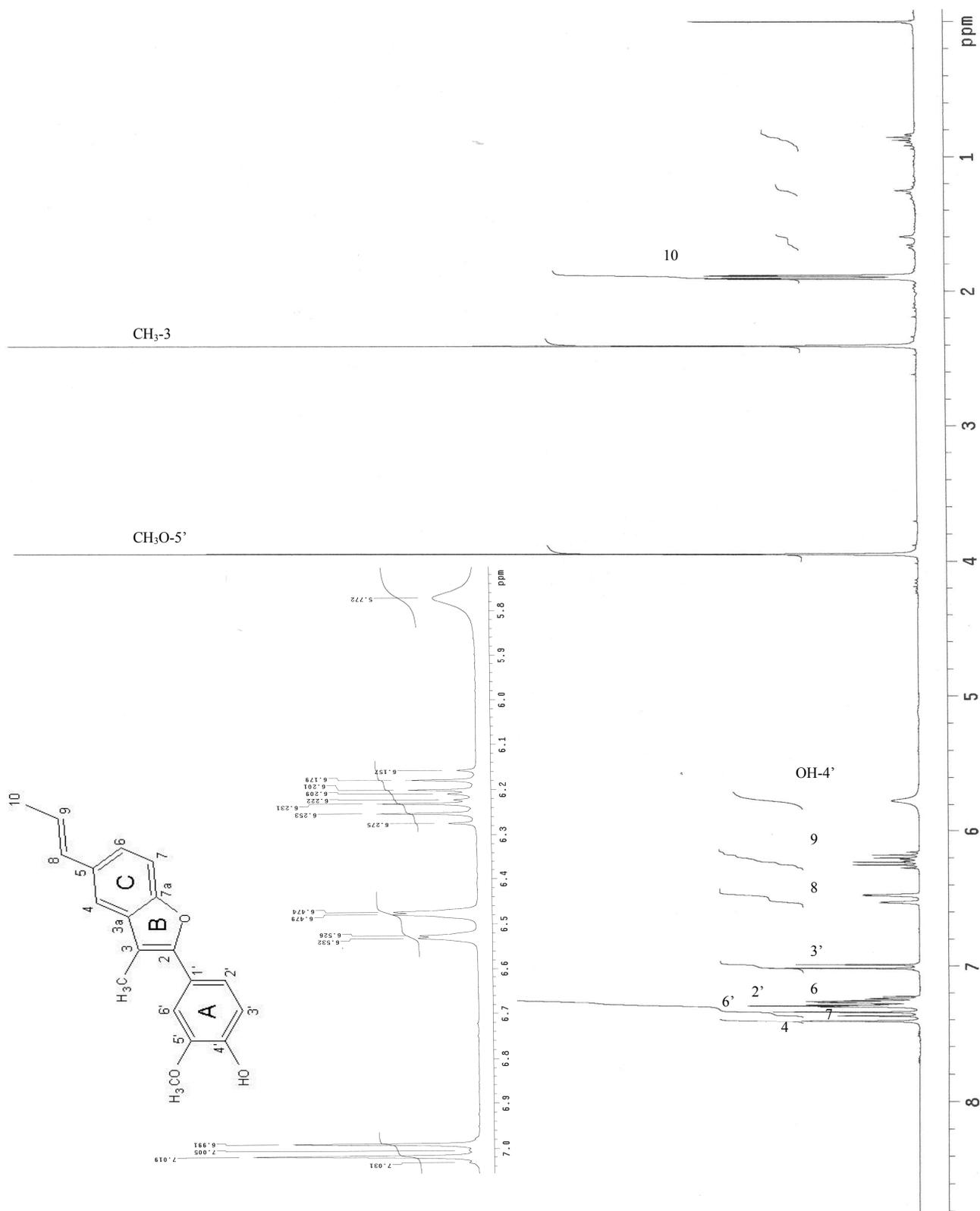


Figura 3: Espectro de RMN ^1H da substância FC-58-62 (300 MHz; CDCl_3).

O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 4, Figura 4) apresentou 19 sinais que foram atribuídos à estrutura, com o auxílio do DEPT (Tabela 4, Figura 4) e do modelo apresentado na literatura para o eupomatenóide-5 (CHAURET et al., 1996). Na região dos aromáticos foram observados 6 sinais de carbonos metínico. Os sinais em δc 151,44 e 153,07 foram atribuídos aos carbonos não hidrogenados C-7 e C-2, respectivamente, que encontravam-se vizinhos ao oxigênio do sistema furânico.

O sinal em δc 146,86 foi atribuído ao C-4' ligado a hidroxila fenólica. O C-6' apresentou um deslocamento químico em δc 109,37 devido a presença de metoxila em posição *orto*, enquanto que o C-2' na posição *para* a metoxila encontra-se em campo baixo (desblindado) com deslocamento químico de δc 120,57. O sinal presente em δc 56,20 foi atribuído ao carbono da metoxila. O sinal em δc 9,63 foi atribuído a metila ligada ao C-3 do anel furano e o sinal em δc 18,70 à metila C-10.

Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C e DEPT (75,5 MHz) em CDCl_3 da FC-58-62, comparados com os valores do eupomatenóide-5 (75,5 MHz) em CDCl_3 , descritos na literatura (CHAURET et al., 1996)*.

C	FC-58-62 δ_c	Eupomatenóide-5 δ_c
1'	124,05	123,49
2	153,07	152,5
3	110,02	109,45
3a	131,76	131,18
4'	146,86	146,28
5	132,86	132,3
5'	145,88	145,31
7a	151,44	150,88
CH		
2'	120,57	120,03
3'	114,76	114,17
4	116,31	115,73
6	122,39	121,82
6'	109,37	108,83
7	110,79	110,22
8	131,47	130,9
9	124,39	123,83
CH₃		
10	18,7	18,11
CH ₃ -3	9,63	9,06
CH₃O	56,2	55,66

*Deslocamentos químicos em ppm (δ_c).

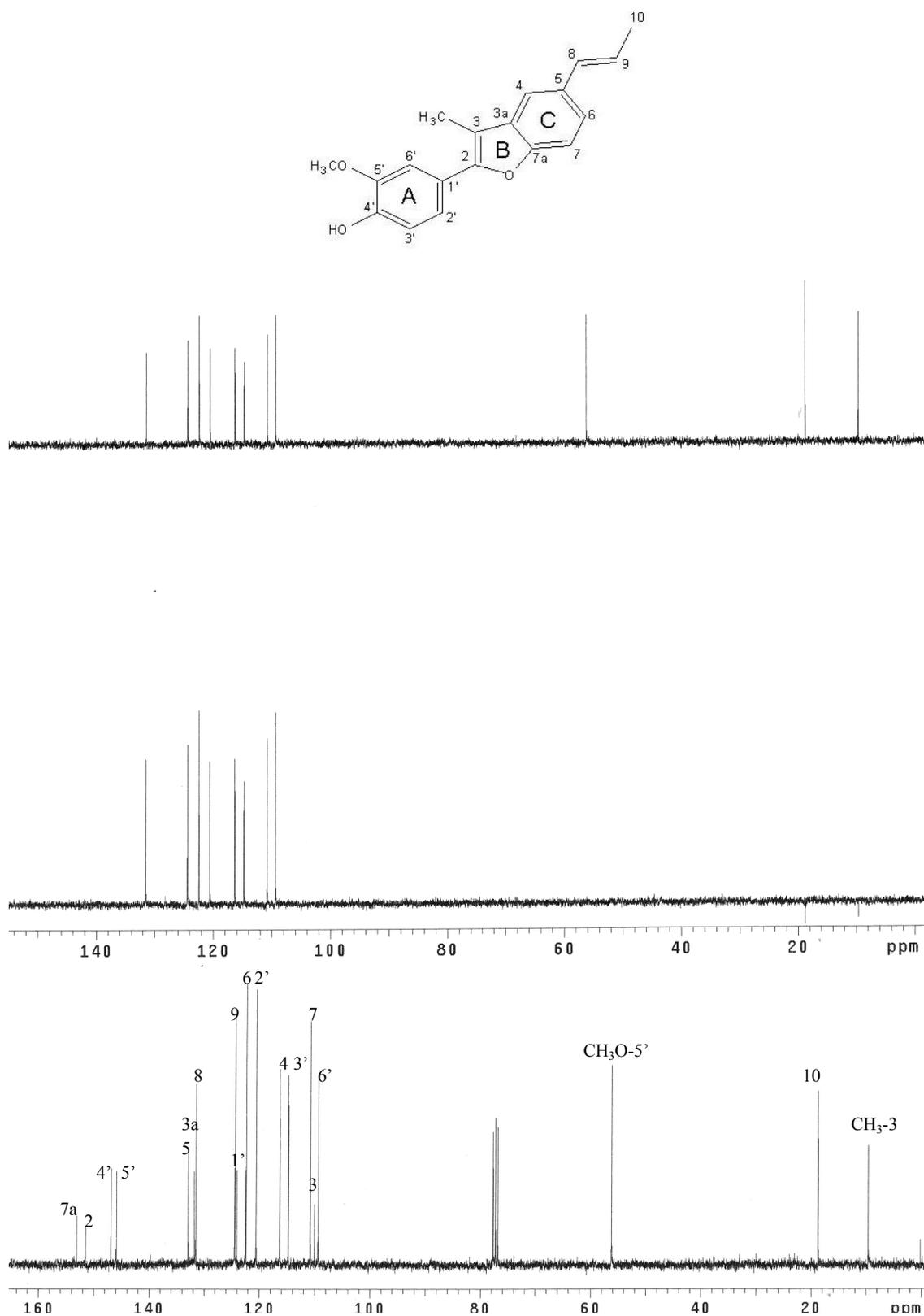


Figura 4: Espectro de RMN ¹³C e DEPT 90° e 135° da substância FC-58-62 (75,5 MHz; CDCl₃).

A interpretação dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT comparadas com os dados encontrados na literatura (CHAURET et al., 1996) e com espectros de amostras autênticas do laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Maringá, permitiram sugerir a estrutura da neolignana diidrobenzofurânica denominada 2-(4'-hidroxi-5'-metoxifenil)-3-metil-5-(*E*)-propenilbenzofurano ou eupomatenóide-5, para a substância FC-58-62.

7.1.2 Dados físicos e espectrométricos

- **Eupomatenóide-5**

Cristais brancos (780 mg)

Ponto de Fusão: 113-115 °C [literatura: 114,7-115,0 °C (CHAURET et al., 1996) e 113-115 °C (MAXWELL et al., 1999)].

UV λ_{max} em CHCl_3 , nm (log ϵ): 235 (9,60), 258 (9,70), 314 (9,62) (PESSINI, 2003).

IV ν_{max} cm^{-1} : 3473, 2970, 2925, 2872, 2845, 1580, 1516, 1459, 1430, 1262 (PESSINI, 2003).

IE/EM m/z (int. rel. %): $[\text{M}]^+$ 294 (100), 293 (5,8), 279 (8,2), 251 (6,7), 147 (5,6), 55 (4,0) (PESSINI, 2003).

ES/EM m/z (int. rel. %): 293 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$ (PESSINI, 2003).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): Tabela 3.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): Tabela 4.

3.15 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.2.1 Estudo do efeito dos extratos brutos, frações e substância pura no crescimento de *L. amazonensis*

Primeiramente, as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 10, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g/ml}$ do extrato bruto fase aquosa 90% e fase acetato 90% (Figura 5). O extrato bruto fase acetato de etila (EBAcEt) apresentou maior atividade sobre *L. amazonensis* com uma concentração inibitória 50% (IC_{50}) de 30 $\mu\text{g/ml}$, quando comparado com o extrato bruto fase aquosa (EBA) (IC_{50} de 167 $\mu\text{g/ml}$) (NAKAMURA et al., 2006).

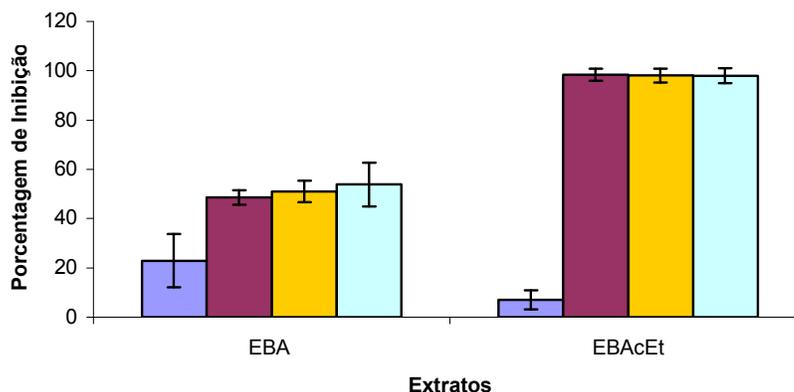


Figura 5: Porcentagem de inibição de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com extrato bruto fase aquosa (EBA) e fase acetato de etila (EBAcEt) em 72 horas de cultivo. ■ 10 $\mu\text{g/ml}$, ■ 100 $\mu\text{g/ml}$, ■ 500 $\mu\text{g/ml}$, ■ 1.000 $\mu\text{g/ml}$.

Após verificar que o extrato bruto fase acetato de etila apresentava maior atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, o mesmo foi submetido ao processo de fracionamento. As frações obtidas foram avaliadas quanto ao efeito antiproliferativo que exerciam sobre os protozoários nas concentrações de 10, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 6). As frações hexano (Fhex) e clorofórmio (Fclo) foram as que apresentaram melhor atividade com um IC_{50} de 21,5 e 32,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Por outro lado as frações de polaridade crescente como a clorofórmio acetato 95:5, 90:10, 50:50, (FCA5, FCA10, FCA50), a fração acetato de etila (FAac), acetona (Face), metanol (Fmet) e metanol água (FMea) apresentaram uma atividade inibitória inferior a do EBACet com um IC_{50} de 176,5, 188,2, 133,3, 123,5, >1.000, >1.000 e >1.000 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (NAKAMURA et al., 2006).

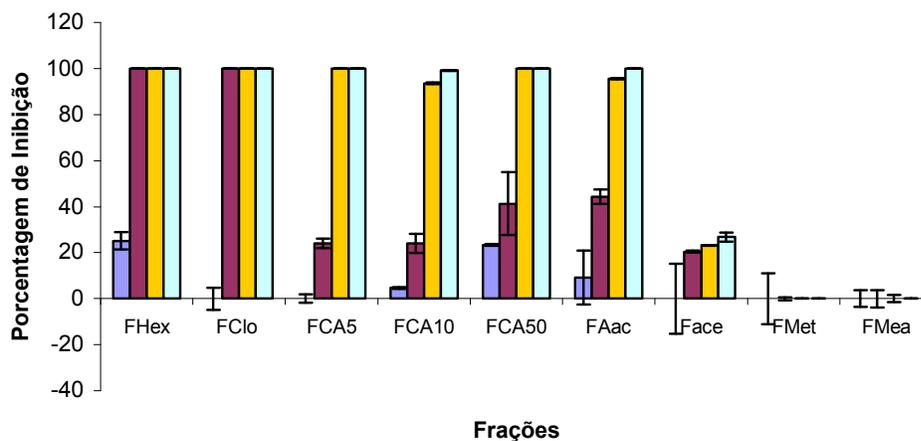


Figura 6: Porcentagem de inibição de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com frações do extrato bruto fase acetato de etila em 72 horas de cultivo. ■ 10 $\mu\text{g/ml}$, ■ 100 $\mu\text{g/ml}$, ■ 500 $\mu\text{g/ml}$, ■ 1000 $\mu\text{g/ml}$.

A substância purificada eupomatenóide-5 foi testada nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$. Na Figura 7 estão plotados os valores das porcentagens de inibição de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$, a substância afetou o

crescimento das formas promastigotas e apresentou porcentagem de inibição acima de 90% a partir de 48 horas de tratamento. Na concentração de 10 µg/ml apresentou 65,6 e 66,1% de inibição respectivamente em 48 e 72 horas de incubação. Os parasitas quando submetidos a esta mesma concentração da substância, mas por 96 horas de tratamento, a porcentagem de inibição teve um significativo aumento, 87,5%.

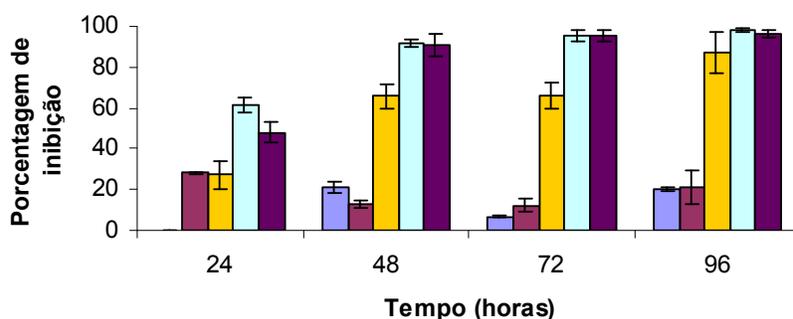


Figura 7: Porcentagem de inibição de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com eupomatenóide-5 durante 96 h de cultivo. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata. ■ 1 µg/ml, ■ 5 µg/ml, ■ 10 µg/ml, ■ 25 µg/ml, ■ 50 µg/ml.

Na Figura 8 estão plotados os valores das porcentagens de inibição de formas amastigotas de *L. amazonensis*. Nas concentrações de 25 e 50 µg/ml, a substância afetou o crescimento dos parasitas e apresentou porcentagem de inibição acima de 85% a partir de 72 horas de tratamento.

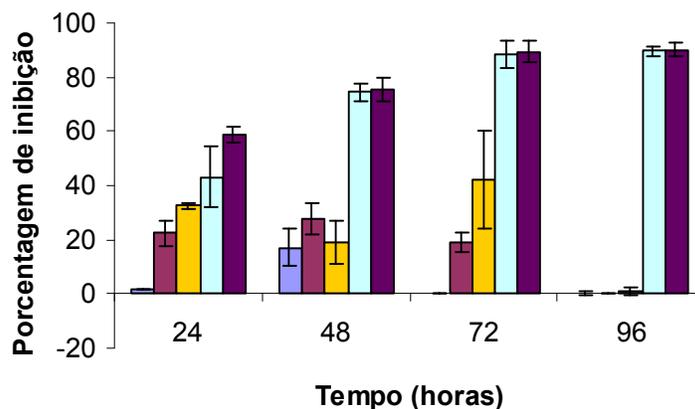


Figura 8: Porcentagem de inibição de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com eupomatenóide-5 durante 96 h de cultivo. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata. ■ 1 µg/ml, ■ 5 µg/ml, ■ 10 µg/ml, ■ 25 µg/ml, ■ 50 µg/ml.

O crescimento do controle de protozoários tratados com no máximo 0,5% de DMSO foi idêntico ao controle sem qualquer tratamento em todos os experimentos, constatando que este solvente não influenciou na ação da substância testada.

4.2.2 Ensaio de citotoxicidade

Macrófagos da linhagem J774G8 foram tratados com diferentes concentrações dos extratos brutos e das frações (Tabela 5). Concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/ml do eupomatenóide-5 também foram testadas. A droga de referência anfotericina B foi testada nas mesmas concentrações. Após 48 h de incubação, a toxicidade foi avaliada pelo

método da sulforrodamina B. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade da substância purificada e da AMPB estão apresentados na Figura 9.

A citotoxicidade para macrófagos J774G8 e para protozoários foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) para células J774G8 e IC₅₀ para protozoários. Os resultados de IS apresentados na Tabela 5 mostram que o EBAcEt e a FHex são 9,1 e 6,4 vezes menos tóxicos para as células J774G8 do que para os protozoários. Resultado interessante também foi obtido com a fração FClo que apresentou atividade leishmanicida semelhante ao do EBAcET, porém com IS de aproximadamente 3,4 vezes maior.

Tabela 5: Comparação dos valores de CC₅₀ para macrófagos J774G8 e IC₅₀ para formas promastigota de *Leishmania amazonensis* e seus respectivos índices de seletividade (IS).

	J774G8	Promastigota	
	CC ₅₀	IC ₅₀	IS
	µg/ml		
EBA	>1.000	167	>5,9
EBAcEt	272	30	9,1
FHex	138	21,5	6,4
FClo	1.000	32	31,2
FCA5	1.000	176,5	5,7
FCA10	300	188,2	1,6
FCA50	300	133,3	2,3
FAac	300	123,5	2,4
Face	>1.000	>1.000	Nd
FMet	940	>1.000	Nd
FMea	>1.000	>1.000	Nd

IS= CC₅₀ J774G8 / IC₅₀ promastigota

Nd = não determinado

O valor do IS para o eupomatenóide-5 neste caso foi de 6,6, evidenciando que a substância purificada é 6,6 vezes menos tóxica para os macrófagos do que para os protozoários (Tabela 6).

Tabela 6: Valor da CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para macrófagos J774G8, IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para promastigotas de *L. amazonensis* e o valor do índice de seletividade (IS).

	CC_{50} J774G8	IC_{50} Promastigotas	IS
Eupomatenóide-5	60	9	6,6

Nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, a porcentagem de células viáveis foi maior que 90% quando tratadas com o eupomatenóide-5, enquanto que a AMPB, nas mesmas concentrações, não atingiu esta porcentagem. Na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, o eupomatenóide-5 manteve resultado satisfatório (80,1% de células viáveis) quando comparado a AMPB (43,1 % de células viáveis).

Em concentrações elevadas, ambos se mostraram tóxicos. Ainda assim, o eupomatenóide-5 manteve porcentagem de células viáveis maior quando comparado com a AMPB.

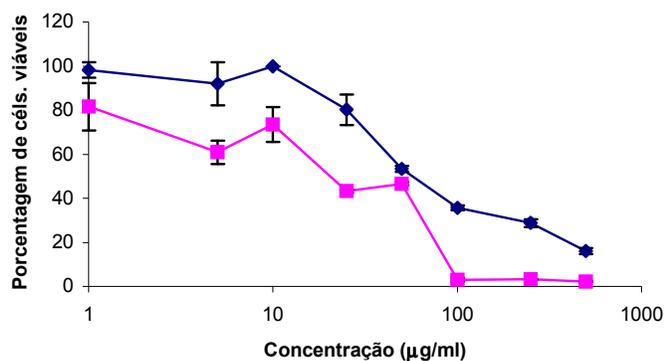


Figura 9: Porcentagem de macrófagos J774G8 viáveis após 48 horas de tratamento com eupomatenóide-5 \blacklozenge e AMPB \blacktriangledown nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$.

O controle das células tratadas com DMSO mostrou valores iguais aos dos macrófagos sem tratamento algum constatando que este solvente não influenciou na viabilidade das células.

A visualização dos macrófagos ao microscópio invertido (Zeiss - Axiovert 25) possibilitou a verificação de mudanças no aspecto das células tratadas com altas concentrações das drogas (Figuras 10 e 11).

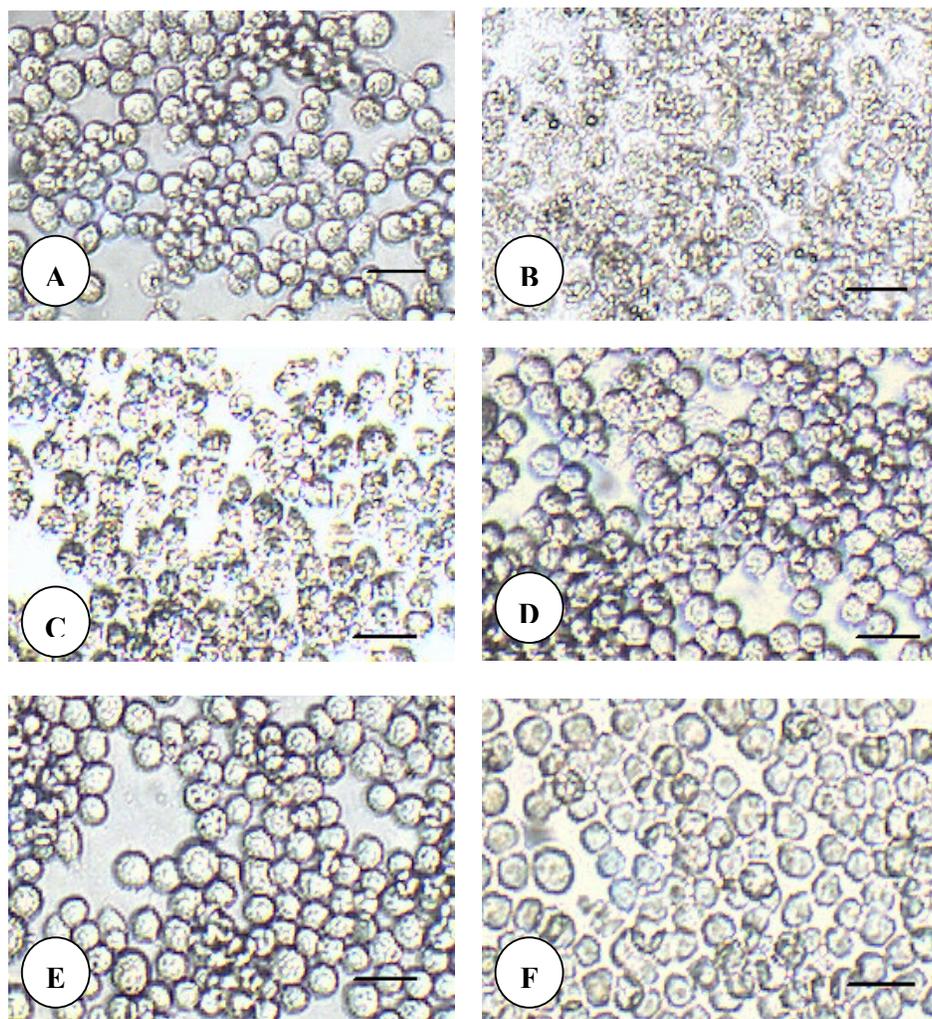


Figura 10: Microscopia fotônica de macrófagos J774G8. Controle (A) e tratados com 250 µg/ml (B), 50 µg/ml (C), 25 µg/ml (D), 10 µg/ml (E) e 5 µg/ml (F) do eupomatenóide-5 após 48 h de incubação. Barras = 30 µm

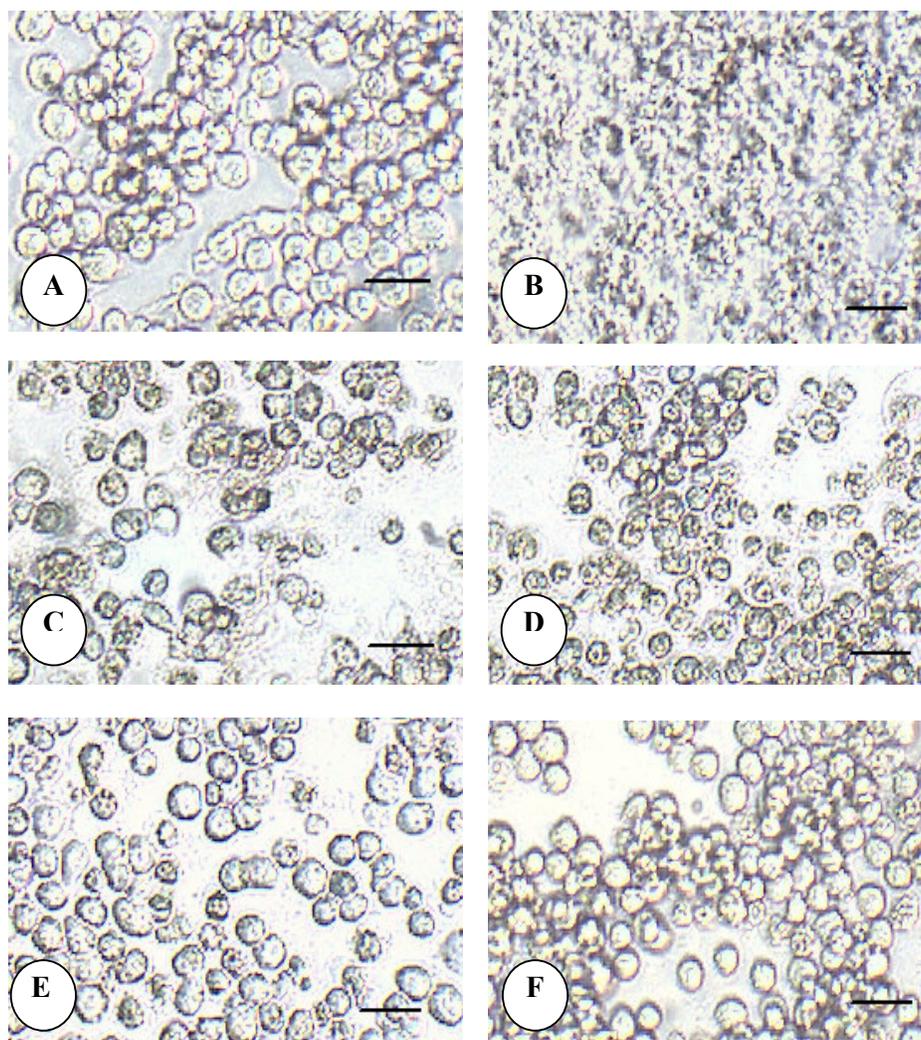


Figura 11: Microscopia fotônica de macrófagos J774G8. Controle (A) e tratados com 250 µg/ml (B), 50 µg/ml (C), 25 µg/ml (D), 10 µg/ml (E) e 5 µg/ml (F) de AMPB após 48 h de incubação. Barras = 30 µm

4.2.3 Efeito do eupomatenóide-5 sobre interação parasita-macrófago

As formas promastigotas de *L. amazonensis* e/ou os macrófagos foram tratados ou não com 1 µg/ml, 10 µg/ml e 25 µg/ml da substância, 20 minutos antes da interação. Este ensaio foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes e os resultados estão ilustrados na Figura 12.

As concentrações testadas não interferem, como demonstrado no ensaio de citotoxicidade, na viabilidade dos macrófagos J774G8.

Analisando os dados verificamos que a atividade da substância foi dose dependente (Figuras 12 A e B). Pode-se ainda dizer que o eupomatenóide-5 foi mais efetivo quando os parasitas foram tratados antes da interação com as células (Figura 12 B).

A concentração de 25µg/ml, considerando a variável parasita pré-tratado, teve um índice de internalização aproximadamente 5 vezes menor em relação ao controle. Na mesma concentração, quando os macrófagos foram pré-tratados, o índice de internalização foi 2,9 vezes menor que o controle.

No tratamento pós-interação (durante 20 min.) não houve diferença significativa no índice de internalização do parasita quando comparado ao controle. (Figura 12 C).

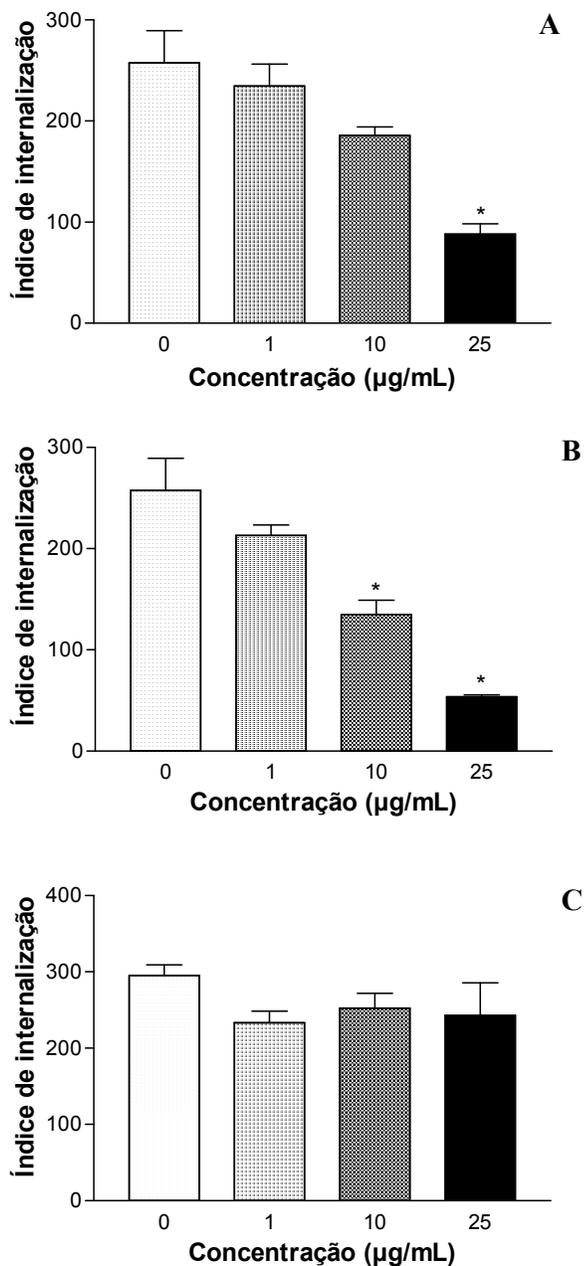


Figura 12: Ensaio de interação de formas promastigotas de *L. amazonensis* com macrófagos J774G8. Os gráficos mostram o índice de internalização em concentrações diferentes do eupomatenóide-5. **(A)** Macrófagos pré-tratados, **(B)** parasitas pré-tratados e **(C)** tratamento pós-interação. * $p < 0,01$. Resultados expressos pelo valor médio de dois experimentos

4.2.4 Alterações morfológicas de formas promastigotas tratadas com eupomatenóide-5

Foram confeccionados esfregaços da cultura de promastigotas de *L. amazonensis* tratada com 9 e 25 µg/ml do eupomatenóide-5 nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Realizou-se a contagem de 200 protozoários e a porcentagem daqueles que apresentavam morfologia alterada esta descrita na Tabela 7. Foram observadas células disformes, arredondadas, sem núcleo e cinetoplasto, com mais de um flagelo e parasitas com tamanho reduzido (Figura 13).

Tabela 7: Porcentagem de promastigotas de *L. amazonensis* com morfologia alterada após tratamento com eupomatenóide-5

Tempo de exposição à substância (horas)	Porcentagem de protozoários alterados		
	Controle	IC ₅₀ 9 µg/ml	IC ₉₀ 25 µg/ml
24	26	76	100
48	30	79	100
72	34	83	100
96	34	87	100

Esta primeira visualização ao microscópio fotônico já possibilitou a verificação de mudanças na estrutura dos protozoários induzida pela substância isolada eupomatenóide-5.

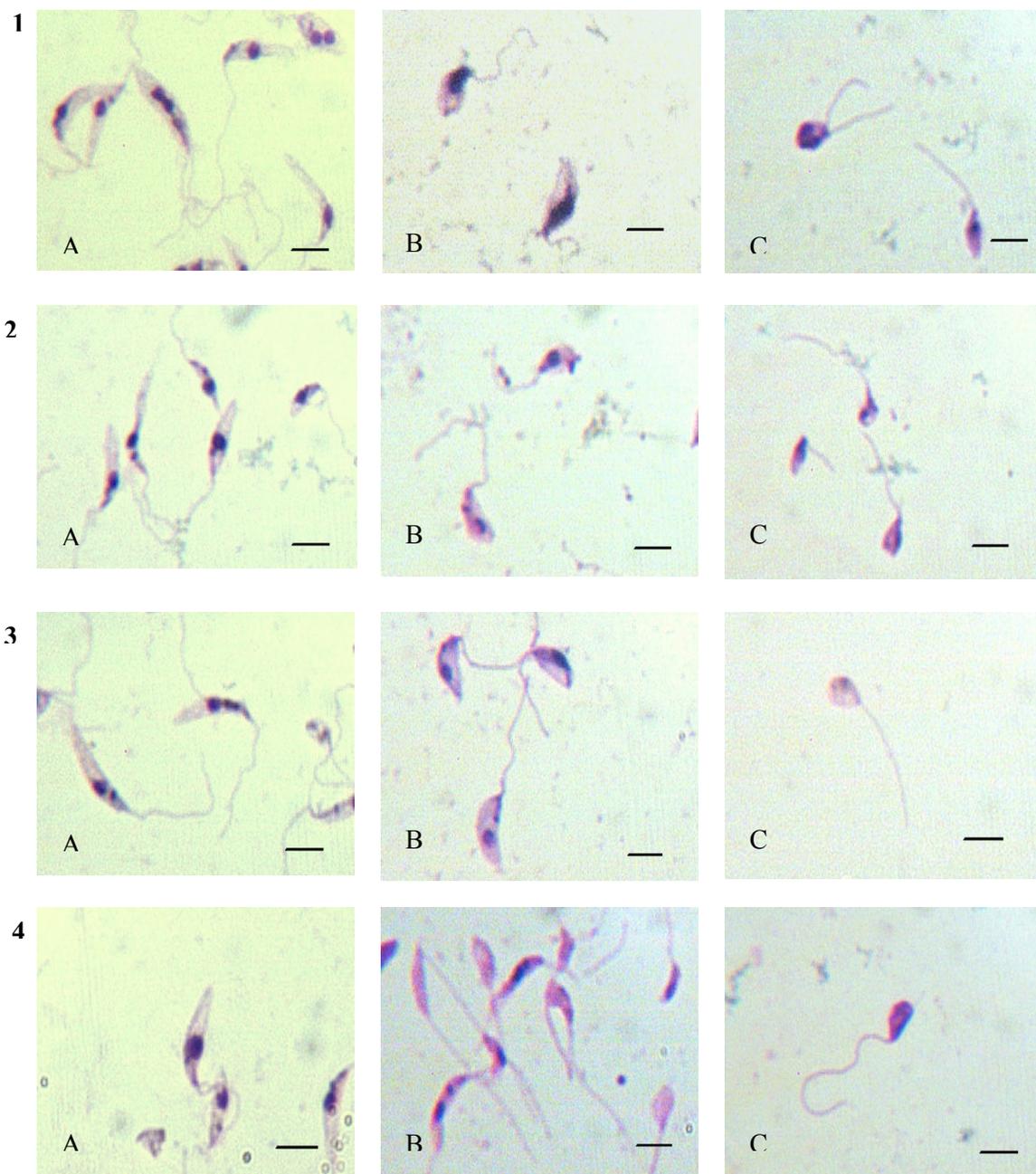


Figura 13: Microscopia fotônica de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. (A) Controle, (B) e (C) cultivadas na presença de 9 µg/ml e 25 µg/ml do eupomatenóide-5 respectivamente. As seqüências de número 1, 2, 3 e 4 correspondem a 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Barras= 5,5 µm.

4.2.5 Alterações ultraestruturais de formas promastigotas tratadas com eupomatenóide-5

As alterações ultraestruturais induzidas pelo tratamento das promastigotas com 9 e 25µg/ml do eupomatenóide-5 foram visualizadas utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

O controle incubado na presença de 0,5% de DMSO e o controle sem tratamento algum não mostraram diferenças estruturais. Os parasitas incubados na presença da substância purificada mostraram alterações morfológicas.

Uma intensa atividade exocítica e protrusões em direção à bolsa flagelar foi verificada em células tratadas com eupomatenóide-5 (Figuras 14 D e E). Outro efeito ultraestrutural observado foi a presença de figuras de mielina (Figura 14 F), característico de processos autofágicos. Foram visualizados vacúolos no corpo celular das promastigotas tratadas com a substância (Figuras 14 B e C). Foi observado o aparecimento de vacúolos mitocondriais nas promastigotas tratadas com o eupomatenóide-5 (Figuras 15 A e B).

Ocorreram casos de binucleação nas promastigotas tratadas com eupomatenóide-5 (Figura 15 F). Considerando que a multiplicação se dá por divisão binária simples, cuja duplicação é iniciada pelo cinetoplasto e posteriormente reproduz-se a estrutura flagelar e finalmente o núcleo (MICHALICK, 1995), infelizmente não se pode afirmar que se trata de alteração provocada pela substância, uma vez que não foi possível a visualização do cinetoplasto no mesmo corte.

As células tratadas com 25 µg/ml do eupomatenóide-5 apresentaram grandes estruturas não visualizadas nas células não tratadas, aparentando ser uma extensão do retículo

endoplasmático (Figuras 15 C, D e E). Esta possibilidade poderá ser avaliada através de análise citoquímica que comprove a natureza destas estruturas.

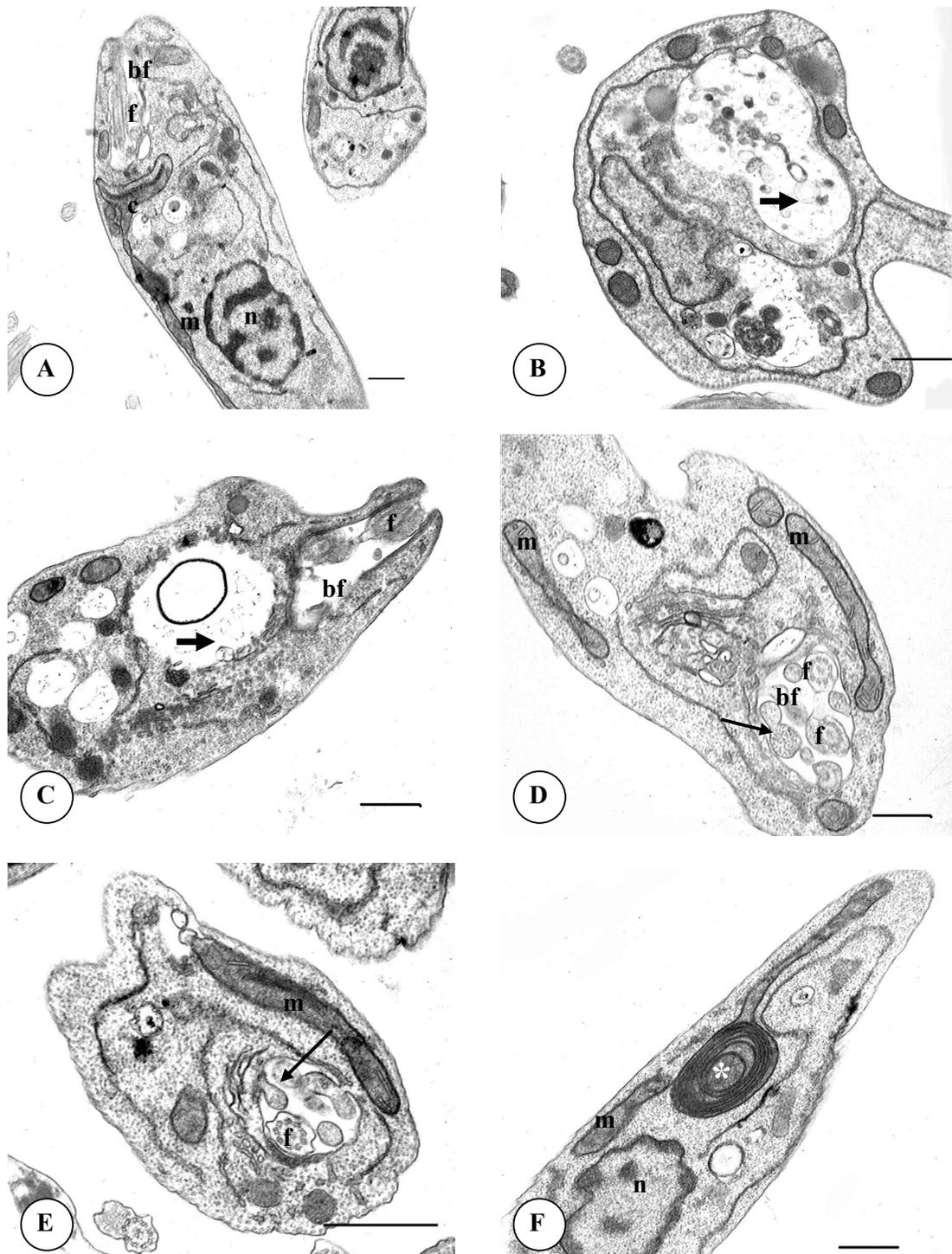


Figura 14: Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. (A) Controle e (B-F) cultivadas na presença de 9 µg/ml de eupomatenóide-5 após 72 h de incubação. As setas finas demonstram intensa exocitose do protozoário. Vacuolização citoplasmática está indicada por setas grossas. Asterisco indica figura de mielina. n, núcleo; m, mitocôndria; c, cinetoplasto; f, flagelo; bf, bolsa flagelar. Barras= 1 µm.

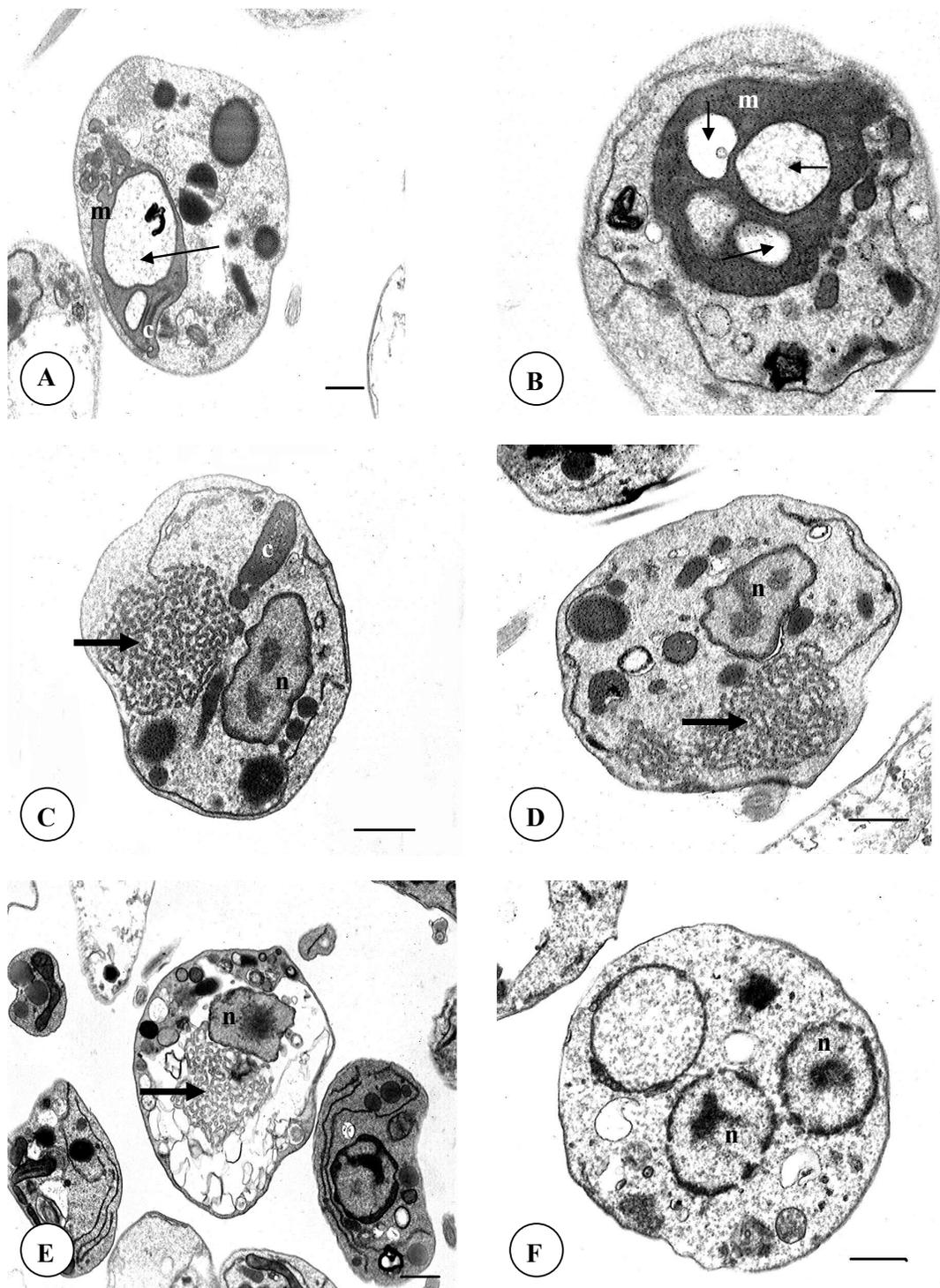


Figura 15: Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. (A-F) Cultivadas na presença de 25 µg/ml de eupomatenóide-5 após 72 h de incubação. As setas finas demonstram vacúolos mitocondriais. Setas grossas apontam estrutura não visualizada no controle. **n**, núcleo; **m**, mitocôndria; **c**, cinetoplasto; **f**, flagelo; **bf**, bolsa flagelar. Barras= 1 µm.

5 DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e substâncias isoladas a partir de folhas de *P. regnellii* var. *pallescens* tem sido demonstrada em diversos estudos do nosso laboratório (PESSINI, 2003; LUIZE, 2004; LUIZE et al., 2005). O processo de fracionamento e obtenção da substância eupomatenóide-5 descrito por Pessini (2003) foi realizado com pequenas modificações, sendo que no processo realizado no presente estudo a fração clorofórmio foi a que apresentou melhor atividade antileishmania e menor toxicidade sobre os macrófagos. Considerando que a análise cromatográfica desta fração revelou a presença de quantidade substancial de eupomatenóide-5, realizou-se o sub-fracionamento da mesma, resultando na obtenção da substância com alto grau de pureza, conforme resultados obtidos através dos estudos químicos. Assim, o procedimento realizado neste trabalho mostrou-se mais eficiente que os descritos por Pessini (2003). Comparando os resultados obtidos no estudo dos extratos brutos (aquoso e acetato de etila) e das 9 frações, nota-se que o fracionamento do extrato bruto fase acetato de etila 90% aumentou em mais de 3 vezes o IS sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (fração F2) (NAKAMURA et al., 2006), justificando assim a importância de uma investigação mais detalhada sobre o modo de ação do eupomatenóide-5, um dos componentes mais abundantes nesta fração, sobre o parasita e sobre a interação parasita-hospedeiro.

A atividade da substância purificada obtida de folhas de *Piper regnellii* sobre *L. amazonensis*, pode ser comparada aos resultados obtidos por Luize et al (2005) em um estudo realizado com formas epimastigotas de *T. cruzi*. Neste estudo verificou-se que o extrato bruto fase acetato de etila assim como as frações menos polares do EBACet apresentaram maior atividade tripanocida. As frações FHex e FClo, a uma concentração de 100 µg/ml, foram

capazes de inibir o crescimento das formas epimastigotas em 92,2 e 86,9 %, respectivamente. Com estes dados e com os dados obtidos no presente trabalho, pode-se considerar que a espécie *P. regnellii* possui atividade contra estes protozoários pertencentes a mesma família.

Bastos et al. (1999), isolaram sete neolignanas das folhas de *Zanthoxylum naranjillo* (Rutaceae). Dessas, três não tiveram atividade contra *T. cruzi*, três possuíam uma atividade relativamente boa, mas somente uma foi altamente eficaz em testes *in vitro* contra o protozoário. Outro trabalho que relatou atividade tripanocida de neolignana foi de Abe et al. (2002). Eles isolaram a partir do extrato metanólico da raiz de *Aristolochia taliscana* quatro neolignanas: eupomatenóide-7, licarina A, eupomatenóide-1 e licarina B. O eupomatenóide-7 imobilizou todas as formas epimastigotas em concentração de 25 µg/ml após incubação por 48 horas.

A atividade do eupomatenóide-5 sobre formas promastigotas em cultura axênica mostrou-se mais efetiva do que sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*. Vários fatores podem estar envolvidos nesse processo, entre eles as características fisiológicas das diferentes formas do parasita, assim como as condições ambientais em que os parasitas se encontram.

O efeito do eupomatenóide-5 sobre a interação parasita-hospedeiro pôde ser melhor evidenciado quando os parasitas foram pré-tratados. O pré-tratamento dos protozoários com a substância pode ter levado a uma alteração de sua superfície e dessa forma prejudicando a interação do mesmo com a célula hospedeira.

Os macrófagos são células do sistema fagocítico monocitário responsáveis por mecanismos de defesa do organismo quando em contato com um agente estranho. Essas células podem ser parasitadas por *Leishmania* e dessa forma, a droga ideal para o tratamento das leishmanioses seria aquela que conseguisse eliminar o protozoário sem provocar danos aos macrófagos, diminuindo assim a possibilidade de provocar efeitos colaterais.

Comparando os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, entre a fração F2 e a substância pura sobre macrófagos, verificamos que o processo de purificação aumentou a atividade antileishmania, entretanto, houve também um aumento da citotoxicidade, uma vez que o CC_{50} apresentado pelo eupomatenóide-5 foi 20 vezes menor que o da fração F2. Ainda assim, o eupomatenóide apresentou um bom IS. Um estudo realizado para avaliar o efeito citotóxico do eupomatenóide-5 em células da linhagem LLCMK2 e em hemácias de carneiro demonstrou que a toxicidade foi observada em concentrações acima da necessária para inibir o crescimento de *T. cruzi* (LUIZE, 2004).

É necessário ressaltar que os testes de toxicidade para produtos naturais são importantes. A população em geral acredita que medicamentos provenientes de plantas são inofensivos. Porém, o uso indiscriminado não garante segurança e, portanto é necessário que exista uma investigação da atividade tanto *in vitro* como *in vivo* para comprovar eficácia e segurança do produto.

Para investigar possíveis alvos de ação da substância purificada sobre *L. amazonensis*, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão. As alterações ultraestruturais encontradas em parasitas tratados com IC_{50} mostram intensa atividade exocítica, revelada por estruturas membranosas na bolsa flagelar, sugerindo que protruções foram formadas pela membrana plasmática e foram liberadas do corpo celular com uma porção do citoplasma. Estudo realizado por Rodrigues et al. (2002) demonstrou que quando as promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 22,26-azasterol (inibidor da síntese de ergosterol), uma intensa atividade exocítica aconteceu, com o aparecimento de estruturas membranosas dentro da bolsa flagelar, sugerindo a possibilidade de secreção de lipídeos anormais nesta região que foram acumulados em decorrência da ação da droga. Desta forma, o mecanismo de exocitose visualizado nos parasitas tratados com eupomatenóide-5 pode significar um processo de defesa na tentativa de eliminar moléculas nocivas que estavam presentes no meio e que foram

absorvidas pelo protozoário. Araújo-Santos et al. (2005) demonstrou que a superexpressão de um transportador intracelular (LtrABCA2) presente em *Leishmania tropica* aumentou a atividade exocítica e diminuiu a infectividade dos parasitas em macrófagos.

Rodrigues et al. (2002) observaram, assim como no presente trabalho, a presença de figuras de mielina em promastigotas tratadas com 22,26-azasterol que está associada ao acúmulo de lipídeos aberrantes em decorrência da não incorporação dos mesmos à membrana plasmática ou à de outras organelas.

Em relação aos vacúolos citoplasmáticos, Bera et al. (2003) verificaram o aparecimento desses em análise ultraestrutural de promastigotas de *L. donovani* tratadas com peptídeos antimicrobianos. Os autores comprovaram através do ensaio com monodensilcaderina (marcador de autofagolisossomo) que se tratava de vacúolos autofágicos, explicando um dos processos pelos quais os peptídeos estariam promovendo morte dos parasitas.

Outra alteração relevante foi o surgimento de vacúolos mitocondriais. Estudos mostraram que alterações mitocondriais ocorreram em promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com agentes leishmanicidas como a licochalcona A (ZHAI et al., 1995), diidroximethoxichalcona (TORRES-SANTOS, et al., 1999), coronaridina (DELORENZI et al., 2001) e 22,26-azasterol (RODRIGUES et al., 2002).

A importância dos produtos naturais na terapêutica é marcante, visto que a diversidade molecular que a natureza oferece é incalculável. As plantas podem ser assim empregadas para o isolamento de substâncias com atividade antileishmanias. Além disso, a utilização destas moléculas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos pode representar o surgimento de um novo grupo de substâncias para a utilização na intervenção terapêutica.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos conclui-se que a substância pura eupomatenóide-5, isolada a partir das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens*, possui atividade anti-protozoário *in vitro* sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

O processo de extração dos compostos da planta e fracionamento até o isolamento da substância aumentou gradativamente a atividade anti-protozoário *in vitro*.

O teste de citotoxicidade em macrófagos J774G8 comprovou que a substância pura apresenta concentrações tóxicas superiores àquelas demonstradas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando, portanto um bom índice de seletividade.

Ensaio da atividade do eupomatenóide-5 na interação parasita-macrófago mostraram que a substância inibe a internalização de *L. amazonensis*, principalmente quando os protozoários foram tratados antes de entrar em contato com as células.

Alterações morfológicas e ultraestruturais das formas promastigotas tratadas com o eupomatenóide-5 reveladas através de microscopia ótica e eletrônica de transmissão, necessitam ser melhor investigadas no intuito de elucidar possíveis mecanismos de ação.

7 REFERÊNCIAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants I. evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco roots of *Aristolochia taliscana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, no. 9, p. 1188-1191, 2002.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, no. 10, p. 462-468, 2005.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; GOMES, D. C. F.; LIMA, M. E. F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L. L. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, no. 6, p. 791-794, 1999.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, no. 3, p. 751-754, 1998.

ARAUJO-SANTOS, J. M.; PARODI-TALICE, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, no. 1, p. 349-355, 2005.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, Austin, v. 28, no. 13, p. 13-19, 1993.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 119, no. 6, p. 238-258, 2004.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 3. ed. São Paulo: A edificação do lar, 1974. v. 2, p. 1053-54.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, no. 5 p. 541-544, 1999.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenilpropanoides and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, New York, v. 52, no. 2, p. 339-343, 1999.

BERA, A.; SINGH, S.; NAGARAJ, R.; VAIDYA, T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 127, no. 1, p. 23-35, 2003.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 10, no. 3, p. 560-586, 1988.

BERMAN, J. D.; HOLZ JR. G. G.; BEACH D. H. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes culture. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 12, no. 1, p. 1-13, 1984.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, no. 4, p. 684-703, 1997.

BLUMENTHAL M. Harvard study estimates consumers spend \$5.1 billion on herbal products? **HerbalGram**, Austin, v. 45, p. 68, 1999.

BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: Universidade Federal Fluminense, p. 300, 1996.

BREVOORT P. The U.S. botanical market. An overview. **HerbalGram**, Austin, v. 36, p. 49-59, 1995.

BRITO A. R. M. S.; BRITO A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, no. 1, p. 53-67, 1993.

CHAURET, D. C.; BERNAD, C. B.; ARNASON, J. T.; DURST, T. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 59, no. 2, p. 152-155, 1996.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of twomchannels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 162, no. 1-2, p. 95-106, 1998.

COSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, no. 8, p. 771-773, 2001.

CROFT, S. L. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 9, no. 10, p. 376-381, 1988.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, no. 11, p. 502-508, 2003.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H. L.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, p. 142-144, 2000.

DE CASTRO, S. L.; SANTA-RITA, R. M.; URBINA, J. A. Antiprotozoal lysophospholipid analogues: a comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumour cells. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 4, no. 2, p. 141-151, 2004.

DELORENZI, J. C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A. C.; HENRIQUES, A. T.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. B. Antileishmanial activity of indol alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, no. 5, p. 1349-1354, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, no. 5, p. 305-318, 2004.

DE SMET P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, New York, v.54, no. 6, p. 801-840, 1997.

EDITORIAL. Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. **The Lancet**, Boston, v. 343, no. 8912, p. 1513-1515, 1994.

EDZARD, E. Harmless herbs? A review of the recent literature. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 104, no. 2, p. 170-178, 1998.

FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany Company**, São Paulo, v. 85, p. 455-460, 2000.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 190, no. 1-2, p. 85-87, 2001.

FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 37, no. 2, p. 159-164, 1992.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980-2001**. Disponível em <http://www.funasa.gov.br/epi/pdfs/casos_conf_por_uf_1980_2001.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2004.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Ateneu, 1995. cap. 7. p. 41-60.

GENTRY, A. M. Phylogeographic pattern as evidence for a Choco refuge. In: Prance, G., (Ed), **Biological Diversification In the tropics**. New York, p.714, 1982.

GREVELINK, A. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. St. Louis, v. 34, no. 2, p. 257-272, 1996.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, no. 12. p. 3864-3874, 1991.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, Boston, v. 354, no. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, no.7, p. 1027-1031, 2002.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N^ω-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 193, no. 6, p. 777-784, 2001.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 10, no. 2, p. 65-68, 1994.

LUIZE, P. S. **Atividade tripanocida do extrato bruto, frações e substâncias isoladas de folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens***. 2004. 100 f. Dissertação - (Mestrado) Departamento de farmácia e farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effect of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 41, no. 1, p. 1-10, 2005.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, New York, v. 23, no. 6, p. 1207-1220, 1984.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L. DA; LUZ, ^a I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, no. 3, p. 200-204, 1987.

MAXWELL, A.; DABIDEEN, D.; REYNOLDS, F. W.; McLEAN, S. Neolignans from *Piper aequale*. **Phytochemistry**, New York, v. 50, no. 3, p. 499-504, 1999.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Ateneu, 1995. cap. 6. p. 34-40.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, Boston, v. 366, no. 29, p.1561-1577, 2005

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, In press, 2006.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

OLDS, G. R.; ELLNER, J. J.; KEARSE, L. A.; KASURA, J. W.; MAHMOUD, A. A. F. Role of arginase in killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 151, no. 6, p. 1557-1562, 1980.

PARIPAROBA. In: CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 5, p. 177-183.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, New York, v. 46, no. 4, p. 597-673, 1997.

PESSINI, G. L. **Estudo fitoquímico, botânico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck., (Piperaceae)**. 2003. 170 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de farmácia e farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, no. 13, p. 7301-7306, 2001.

PRISTA, L. N.; CORREIA, A. A.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. v. I, 1220 p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, Oxford, v. 39, no. 5, p. 603-613, 2001.

ROBERTS, L. J.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, no. 9, p. 1705-1710, 1997.

RODRIGUES, J. C. F.; ATTÍAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigota and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, no. 2, p. 487-499, 2002.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Cróton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, no. 6, p. 1895-1901, 2003.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 19, no. 3, p. 195-200, 1986.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, New York, v. 58, p. 547-551, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 15, p. 371-400.

SCHULTES, R. E. The Amazonia as a source of new economic plants. **Economic Botany**, v. 33, p. 259-266, 1979.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, Milan, v. LVVIII, no. 3, p. 147-166, 1987.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, Basel, v. 74, no. 1, p. 25-31, 2000.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. p. 1-44.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, no. 1, p. 176-182, 2005.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, no. 5, p. 1234-1241, 1999.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v. 87, no. , p. 89-97, 2001.

VANNIER-SANTOS, M. A.; URBINA, J. A.; MARTINY, A.; NEVES, A.; SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 42, no. 4, p. 337-346, 1995.

VIEIRA, M. C. F.; DUTRA, J. M. F.; CARVALHO, T. U.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 118, no. 6, p. 491-499, 2002.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. parte I, cap. 1, p. 19-46.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: geographical distribution**. In: WHO. Communicable Diseases Surveillance and Response. Geneva: WHO, ©2001a. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>>. Acesso em: 05 dez. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: the disease and its impact**. In: WHO. Communicable Diseases Surveillance and Response. Geneva: WHO, ©2001b. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>>. Acesso em: 05 dez. 2004.

WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J. D. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. **Phytotherapy Research**, London, v.4, no. 4, p. 127-139, 1990.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, no. 12, p. 2742-2748, 1995.