



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**Departamento de Farmácia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



EVERTON DA SILVA SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO EXTRATIVO A PARTIR DOS FRUTOS DE  
*Pterodon pubescens* BENTH. COM VISTAS A OBTENÇÃO DE EXTRATOS E  
FORMULAÇÕES COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA**

MARINGÁ, 2017

EVERTON DA SILVA SANTOS

**Otimização de um método extrativo a partir dos frutos de *Pterodon pubescens*  
Benth. com vistas a obtenção de extratos e formulações com atividade  
antileishmania**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora Prof. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso

MARINGÁ, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S237o Santos, Everton da Silva  
Otimização de um método extrativo a partir dos frutos de *pterodon pubescens* benth. com vistas a obtenção de extratos e formulações com atividade antil / Everton da Silva Santos. -- Maringá, 2017.  
89 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mara Lane Carvalho Cardoso.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Pterodon pubescens*. 2. Nanoemulsão. 3. Geranilgeraniol. 4. *Leishmania amazonensis*. 5. Extrato fluido supercrítico. I. Cardoso, Mara Lane Carvalho, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 23.ed. 615.32

ECS

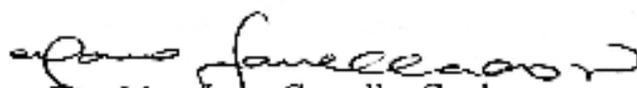
**EVERTON DA SILVA SANTOS**

**OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO EXTRATIVO A PARTIR DOS FRUTOS  
DE *Pterodon pubescens* BENTH. COM VISTAS A OBTENÇÃO DE  
EXTRATOS E FORMULAÇÕES COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03 de fevereiro de 2017.

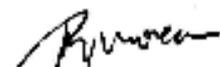
**BANCA EXAMINADORA**



Dra. Mara Laine Carvalho Cardoso  
*Universidade Estadual de Maringá*



Dra. Elizandra Aparecida Britta Stefano  
*Universidade Estadual de Maringá*



Dra. Raquel Regina Duarte Moreira  
*Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho*

Dedico essa dissertação a Manoel e Maria, que em nenhum momento mediram esforços para incentivar a busca pelos meus sonhos, me guiar pelos caminhos corretos e escolher as melhores escolhas, mostrar que a honestidade e o respeito são essenciais a vida. A eles devo o homem que me tornei, e tenho muito orgulho de chamá-los de pai e mãe. Dedico também aos meus irmãos Edson e Erica por todo incentivo, apoio, companheirismo em todos os momentos que precisei.

*AMO VOCÊS*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refugio e força, que sempre me forneceu respostas e caminhos certos

Aos meus pais, Manoel Maria Santos e Maria Pereira da Silva, e irmãos Edson Silva Santos e Erica Silva Santos, pelo amor infinito desde sempre

A professora Dra Mara Lane Carvalho Cardoso, que sempre confiou no meu potencial e me acolheu como um verdadeiro filho

Aos meus amigos de laboratório e da Pós-graduação que a UEM me forneceu, em especial Paulo Goes, Jaqueline Hoscheid, Priscila Outuki e Adriana Kleinubing, vocês foram essenciais e continuaram sendo

Aos meus amigos formandos por todas as repúblicas que passei, em especial a Kaio Leite e Fred Terçariol, por mais longe que nossas casas estavam, nos tornamos uma verdadeira família

Aos professores da Pós graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF) por todo ensinamento ao longo desses dois anos

Aos professores Dr Celso Nakamura e Dr Lúcio Cardozo-Filho, por ceder os materias e disponibilidade de seus respectivos laboratórios, e a doutoranda Francielle Garcia por sempre ter me auxiliado na parte microbiológica do trabalho

A melhor secretária do mundo, Franscisca Helena Mesquita de Carvalho

E todos que direta ou indiretamente contribuíram nessa longa jornada

MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS DO FUNDO DO CORAÇÃO!

*"O conhecimento nos faz responsáveis"*  
*(Che Guevara).*

SANTOS, ES 2017. Otimização de um método extrativo a partir dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth. com vistas a obtenção de extratos e formulações com atividade antileishmania. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 89f.

## RESUMO

Atualmente, há um desafio no tratamento de leishmaniose devido ao número limitado e alta toxicidade dos fármacos disponíveis e surgimento de protozoários resistentes. As plantas medicinais brasileiras, por sua vasta flora, produzindo várias moléculas bioativas, podem ajudar a combater esta escassez global de fármacos antileishmania. E extrações por fluidos supercríticos são extrações verdes que se destinam a proteger o meio ambiente por não utilizar solventes orgânicos danosos. Neste estudo, foram preparados e otimizados extratos de frutos de *Pterodon pubescens*, com atividade antileishmania, e desenvolveram-se nanoemulsões com o objetivo de melhorar a atividade antileishmania e diminuir sua citotoxicidade. Os extratos foram preparados utilizando métodos convencionais (turboextração e maceração) e o método de fluido supercrítico foram testados quanto à atividade contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Os dois extratos mais eficazes foram formulados como nanoemulsões. Embora ambos os extratos tenham mostrado citotoxicidade com  $CC_{50}$  de 35,3; 36,3 e 35,5  $\mu\text{g/mL}$  para a fração turboextraída, macerada e extrato supercrítico, respectivamente, os extratos supercríticos foram mais eficazes contra as promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* com  $CI_{50}$  de 26,3 e 33,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, contra 42 e 52,1 de  $CI_{50}$  em promastigotas, com as frações hexânicas turboextraídas e maceradas. Isto foi atribuído ao elevado teor de derivado de geraniogeraniol nos extratos supercríticos, justificando esta melhora na atividade. Já as nanoemulsões mostraram uma significativa melhora na atividade contra os parasitas (amastigotas intracelulares) ( $CI_{50}$ : 2,7  $\mu\text{g/mL}$  para nanoemulsão da fração hexânica turboextraída, e  $CI_{50}$ : 1,9  $\mu\text{g/mL}$  para nanoemulsão com extrato supercrítico) comparado ao padrão de Miltefosina (0,7  $\mu\text{g/mL}$ ), melhorando também o índice de seletividade para 1,37 para nanoemulsão da fração hexânica e 1,68 para o extrato supercrítico. Isto poderia ser devido às gotículas menores dos extratos supercríticos, permitindo uma melhor penetração. Em conclusão, os extratos e nanoemulsões mostraram-se promissores em testes *in vitro*, e estudos *in vivo* são necessários. Mas, coloca os extratos dos frutos da espécie como possível tratamento alternativo contra leishmaniose.

**Palavras-chave:** *Pterodon pubescens*, nanoemulsão, geraniogeraniol, *Leishmania amazonensis*, extrato fluido supercrítico

SANTOS, ES 2017. Optimization of extractive method from fruit *Pterodon pubescens* Benth. Toward extracts and formulations with obtaining antileishman activity. Master degree, Postgraduate program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, 89f.

### ABSTRACT

Currently, leishmaniasis is difficult to manage owing to the limited choice and high toxicity of available drugs, and emergence of drug-resistant protozoa. Medicinal Brazilian plants, which produce various bioactive molecules, can help counter this global shortage antileishmanial. And extracting by supercritical fluid extractions is green intended to protect the environment by not using harmful organic solvents. In this study, we prepared *Pterodon pubescens* fruit extracts, which show antileishmanial activity, and developed a nanoemulsion of the optimized extract to improve its performance in order to improve the antileishmanial activity and decrease its cytotoxicity. The extracts were prepared using conventional methods (turboextraction and maceration) and a supercritical fluid method and were tested for activity against *Leishmania amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes. The two most effective extracts were formulated as nanoemulsions. Although both extracts showed cytotoxicity with  $CC_{50}$  of 35.3; 36.3 and 35.5  $\mu\text{g/mL}$  for the turboextracted fraction, macerated and supercritical extract respectively, the supercritical extracts were more effective against *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes with  $IC_{50}$  of 26.3 and 33.8  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, against 42 and 52.1  $IC_{50}$  in promastigotes, with hexanic fractions turboextracted and macerated. This was attributed to the high content of the geranylgeraniol derivative in the supercritical extracts. The nanoemulsions showed a better selectivity index and significantly improved activity against parasites ( $IC_{50}$ : 2.7  $\mu\text{g/mL}$  for nanoemulsion of hexane extract;  $IC_{50}$ : 1.9  $\mu\text{g/mL}$  for nanoemulsion of supercritical extract) compared to the miltefosine standard (0.7  $\mu\text{g/mL}$ ). This could be due to the smaller droplets of the supercritical extracts, allowing better penetration. In conclusion, the extracts and nanoemulsions proved promising *in vitro* tests. and *in vivo* studies are necessary. But puts the fruits of the species as possible alternative treatments against leishmaniasis.

**Keywords:** *Pterodon pubescens*, nanoemulsion, geranylgeraniol, *Leishmania amazonensis*, supercritical fluid extraction

## INFRAESTRUTURA UTILIZADA

As extrações pelos métodos convencionais (turboextração e maceração) foram realizadas no laboratório de P&D de Fitoterápicos da Profa. Dra. Mara lane C. Cardoso, sala número 12 (K80) UEM, enquanto que as extrações supercríticas foram realizadas em parceria com o laboratório do prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho do departamento de Engenharia Química da UEM.

As nanoemulsões - NE foram preparadas em parceria entre o Laboratório de P&D de Fitoterápicos da Profa. Dra. Mara Lane C. Cardoso, sala número 12 (K80) UEM, e o Laboratório de Pesquisa e desenvolvimento de Sistema de Liberação de Fármacos (K80) UEM, do Prof. Dr Marcos Luciano Bruschi.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Bloco B-08 do Prof. Dr Celso Vataru Nakamura.

Parte deste trabalho foi publicada na revista *Experimental Parasitology* (Santos *et al.*, 2016. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts. **Experimental Parasitology**, v. 170 (2016), p. 252 a 260).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura e características da forma amastigota intracelular (a) e promastigota (b) de leishmania. ....	20
<b>Figura 2.</b> Ciclo da doença leishmaniose, utilizando o humano como reservatório hospedeiro.....	21
<b>Figura 3.</b> Fêmeas dos gêneros <i>Lutzomyia</i> (a) e <i>Phlebotomus</i> (b) vetores das leishmanioses se alimentando.....	21
<b>Figura 4.</b> Mapa de distribuição geográfica da ocorrência de leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea.....	24
<b>Figura 5.</b> Fotos de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.....	34
<b>Figura 6.</b> Esquema de um diagrama de fases de uma substância pura.....	36
<b>Figura 7.</b> Metodologia empregada na extração de extratos oleaginosos de frutos de <i>P. pubescens</i> no fluido supercrítico. ....	44
<b>Figura 8.</b> a) Extração por turboextração; c) extração por maceração; b e d) Fracionamento dos extratos brutos de <i>P. pubescens</i> (EB's).....	46
<b>Figura 9.</b> Cinética do rendimento na extração por fluido supercrítico dos frutos de <i>P. pubescens</i> .....	57
<b>Figura 10.</b> Gráfico de superfície de resposta tridimensional mostrando o efeito das variantes independentes, temperatura e pressão, no rendimento extrativo das extrações por fluido supercrítico.....	59
<b>Figura 11.</b> Derivados de geranil presentes nos extratos dos frutos de <i>P. pubescens</i> , possivelmente responsáveis pela promissora atividade antileishmania, 1: geranilgeraniol; 2: 14,15 epoxigeranilgeraniol.....	60
<b>Figura 12.</b> Gráfico obtido pelo análise quimiometria de dados obtidos pelo CG-EM de todos os extratos por EFS.....	62
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas da fração hexânica (turboextração) e dos extratos fluidos supercríticos dos frutos da <i>P. pubescens</i> .....	63
<b>Figura 14.</b> Fotos obtidas pelo microscópio óptico, do ensaio de interação entre amastigotas e macrófagos peritoneais, tratados com as NE.....	69
<b>Figura 15.</b> Derivados de vouacapanos presentes nos extratos dos frutos de <i>P. pubescens</i> , possivelmente responsáveis pela citotoxicidade. 4 e 5; voucapanos isômeros (Metil 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato e o Metil 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapano-17 $\beta$ -oato). ....	72
<b>Figura 16.</b> Hipótese da ação das nanoemulsões frente as formas amastigotas (interação com macrófagos) de <i>L. amazonensis</i> .. ....	73

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Tabela dos gases (fluidos) mais comumente utilizados nas EFS. ....	37
<b>Tabela 2.</b> Matriz experimental dos parâmetros utilizados nas extrações por fluido supercrítico. ....	44
<b>Tabela 3.</b> Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central conseguido pelos testes preliminares. ....	45
<b>Tabela 4.</b> $CI_{50}$ dos extratos sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> nos testes preliminares...	53
<b>Tabela 5.</b> Somatória da áreas dos picos dos cromatogramas dos extratos utilizados no teste preliminar, obtidos por CG-EM. ....	54
<b>Tabela 6.</b> Rendimento em massa extrativa por EFS referente ao teste preliminar. ....	54
<b>Tabela 7.</b> Rendimento extrativo dos extratos referentes aos métodos de turboextração e maceração.	55
<b>Tabela 8.</b> Efeito antiproliferativo em promastigotas na comparação entre metodologias de extrações dos frutos de <i>P. pubescens</i> . $CI_{50}$ e $CI_{90}$ ....	56
<b>Tabela 9.</b> Dados obtidos pelo cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas CG-EM, com os extratos por turboextração (FHe1) e supercrítico (EOe4 a EOe8). ....	59
<b>Tabela 10.</b> Atividade da FHe1 e EOe4 e suas respectivas nanoemulsões em amastigotas intracelulares .....	67
<b>Tabela 11.</b> Características das NE testadas frente a formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> . ....	68
<b>Tabela 12.</b> Ensaio de citotoxicidade em macrófagos ( $CC_{50}$ ), dos três extratos na otimização de um método extrativo.....	71

**LISTA DE EQUAÇÕES**

<b>Equação 1.</b> Equação utilizada para a diluição dos compostos. ....	48
<b>Equação 2.</b> Equação para a padronização do inóculo de promastigotas (Pip). ....	49
<b>Equação 3.</b> Equações para os cálculos das porcentagens de inibições nas formas amastigotas intracelulares (interação com macrófagos peritoneais). ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALB/c	Raça de camundongos albinos
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica de 50%
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% dos parasitas
CI <sub>90</sub>	Concentração inibitória de 90% dos parasitas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTP	Citidina Trifosfato
C1	Concentração um
C2	Concentração dois
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Dispersão de luz dinâmica)
DMPP	Demitilallil Difosfato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EB's	Extratos brutos
EFS	Extrato Fluido supercrítico
EOe's	Todos os extratos supercríticos do teste definitivo
EOe1	Extrato fluido Supercrítico – Propano líquido (40°C; 40 bar)
EOe2	Extrato fluido Supercrítico – Propano líquido (80°C; 13 bar)
EOe3	Extrato fluido Supercrítico – Dióxido de Carbono (40°C; 100 bar)
EOe4	Extrato fluido Supercrítico – Dióxido de Carbono (20°C; 120 bar)
EOe5	Extrato fluido Supercrítico – Dióxido de Carbono (60°C; 80 bar)
EOe6	Extrato fluido Supercrítico – Dióxido de Carbono (60°C; 120 bar)
EOe7	Extrato fluido Supercrítico – Dióxido de Carbono (40°C; 100 bar)
EOe8	Extrato fluido Supercrítico – Dióxido de Carbono (20°C; 80 bar)
FAq's	Frações aquosas
FAq1	Fração aquosa turboextraída dos frutos de <i>Pterodon pubescens</i>
FAq2	Fração aquosa macerada dos frutos de <i>Pterodon pubescens</i>
FHe's	Frações hexânicas
FHe1	Fração hexânica turboextraída dos frutos de <i>Pterodon pubescens</i>
FHe2	Fração hexânica macerada dos frutos de <i>Pterodon pubescens</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HO	Hospedeiro
IPP	Isopentenil Difosfato
IS	Índice de seletividade
ISO	Índice de sobrevivência
IspH	4 Hidroxi-3-metilbut-2-enil Difosfato Redutase
IspG	4 Hidroxi-3-metilbut-2-enil Difosfato Sintase
J774A1	Macrófagos de linhagem
K	Variáveis
LC	Leishmania Cutânea
LCD	Leishmania Cutânea Difusa
LC <sub>50</sub>	Concentração letal de 50%
LM	Leishmania Mucocutânea
LV	Leishmania Visceral
LTA	Leishmania Tegumentar Americana
MEP	Metileritritol Fosfato
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio bromide formazano

MØ	Macrófagos
N.FE1	Nanoemulsão da fração hexânica (turboextração) dos frutos de <i>P pubescens</i>
N.EOe4	Nanoemulsão com o extrato supercrítico-CO <sub>2</sub> (20 T 120 P) dos frutos de <i>P. pubescens</i> .
P	Fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDI	Índice de polidispersidade
<i>P. pubescens</i>	<i>Pterodon pubescens</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffera Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PI	Porcentagem de inibição
Pip	Padronização do inóculo de promastigotas
PP	Difosfato
PS	Porcentagem de sobrevivência
p/p	Peso/Peso
RPMI 1640	Meio de aminoácidos, vitaminas para o crescimento celular
SFB	Solução fetal bovina
V1	Volume um
V2	Volume dois
Ø	Fluxo
$\bar{x}$	Média

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	LEISHMANIOSES .....	19
<b>2.1.1</b>	<b>Características gerais.....</b>	<b>19</b>
2.1.1.1	Leishmaniose Visceral (Calazar).....	22
2.1.1.2	Leishmania Tegumentar Americana .....	23
2.1.1.2.1	Leishmaniose Cutânea (LC) .....	23
2.1.1.2.1.1	Cutânea Localizada (LCL).....	23
2.1.1.2.1.2	Cutânea Difusa (LCD) .....	23
2.1.1.2.1.2.1	<i>Leishmania amazonensis</i> .....	24
2.1.1.2.1.3	Leishmaniose Mucocutânea (LMC) .....	24
<b>2.1.2</b>	<b>Tratamento das Leishmanioses.....</b>	<b>25</b>
2.1.2.1	Antimoniais .....	25
2.1.2.2	Anfotericina B .....	26
2.1.2.3	Pentamidinas .....	26
2.1.2.4	Miltefosina .....	27
2.2	PLANTAS MEDICINAIS .....	27
<b>2.2.1</b>	<b>Metabolismo vegetal.....</b>	<b>28</b>
2.3	BIOATIVIDADES .....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Na família Fabaceae.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.2</b>	<b>No gênero <i>Pterodon</i>.....</b>	<b>29</b>
2.3.2.1	Bioatividade dos compostos isolados.....	30
2.3.2.1.1	Geranilgeraniol .....	30
2.3.2.1.2	Epoxi-geranilgeraniol .....	30
2.3.2.1.3	Diterpenos furânicos vouacapanos .....	31
<b>2.3.3</b>	<b>Na espécie <i>Pterodon pubescens</i> Benth.....</b>	<b>32</b>
2.3.3.1	Características gerais de <i>Pterodon pubescens</i> Benth. ....	33
2.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÕES DE PLANTAS MEDICINAIS .....	34
<b>2.4.1</b>	<b>Maceração.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Turboextração .....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Fluido Supercrítico-EFS .....</b>	<b>35</b>
2.5	NANOEMULSÕES (NE) .....	37
3	OBJETIVOS .....	39
3.1	Objetivo geral.....	39

3.2	Objetivos específicos.....	39
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	40
4.1	MATERIAIS.....	40
<b>4.1.1</b>	<b>Fármacos, Solventes e Reagentes.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Equipamento, aparatos e acessórios.....</b>	<b>40</b>
4.2	MÉTODOS.....	42
<b>4.2.1</b>	<b>Coleta e identificação.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Conservação e estocagem.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Métodos extrativos.....</b>	<b>42</b>
4.2.3.1	Extrações para os testes antileishmania preliminares.....	42
4.2.3.2	Extrações para os testes antileishmania finais.....	43
4.2.3.2.1	Extratos por Fluido supercrítico.....	43
4.2.3.2.1.1	Planejamento fatorial para a EFS-CO <sub>2</sub> .....	45
4.2.3.2.2	Extração por turboextração.....	45
4.2.3.2.3	Extração por maceração.....	45
4.2.3.2.3.1	Fracionamento dos extratos brutos etanólicos de <i>P. pubescens</i> .....	46
<b>4.2.4</b>	<b>Preparação das nanoemulsões NE.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Caracterização físico-química das NE.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.5.1</b>	<b>Tamanho de gotícula.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Análises em Cromatografia Gasosa acoplada ao espectro de massas CG/MS.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Ensaio de suscetibilidade.....</b>	<b>48</b>
4.2.7.1	Ensaio antiproliferativo com promastigotas.....	48
4.2.7.2	Atividade leishmanicida em amastigotas intracelulares.....	49
<b>4.2.8</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.9</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1	ANÁLISES PRELIMINARES.....	53
<b>5.1.1</b>	<b>Teste para comprovar a atividade dos extratos de <i>P. pubescens</i> em <i>L. amazonensis</i>....</b>	<b>53</b>
5.2	ANÁLISES DEFINITIVAS.....	55
<b>5.2.1</b>	<b>Otimização de um melhor extrato com as diferentes metodologias de extração.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Testes com os melhores extratos e suas respectivas nanoemulsões.....</b>	<b>66</b>
6	CONCLUSÃO.....	74
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios o homem busca alternativas de tratamentos que aumentem ou melhorem suas chances de sobrevivência. E através da observação e experimentação, a humanidade descobriu que o uso dos vegetais poderia ser benéfico para a recuperação de saúde (Lorenzi e Matos, 2008). O uso de plantas é uma prática que acompanha culturas de quase todos os povos, não sendo diferente no Brasil, em função de sua vasta e generosa flora e pobreza social (Grégio *et al.*, 2006). A conexão entre plantas e a saúde foi responsável pelo início de uma nova geração de terapia, que inclui fármacos derivados de plantas, a planta ou de suas estruturas (Corrêa *et al.*, 2008). A escolha da espécie deste trabalho, foi baseada na afirmação de Dias *et al.* (2005), que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso popular do que em plantas escolhidas ao acaso.

A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada em termo de pesquisa e desenvolvimento, recebendo pouca atenção e recursos, apesar do impacto no desenvolvimento econômico e qualidade de vida (Jhingran *et al.*, 2008; Kaye e Scott, 2011; Freitas-Junior *et al.*, 2012), havendo necessidade de novas políticas de controle, prevenção, pesquisa e desenvolvimento pelo poder público e privado melhorando diagnóstico e tratamento (Pinheiro, 2012). A zoonose está entre as seis doenças tropicais de maior importância mundial, afetando principalmente países emergentes. Cerca de 350 milhões de pessoas apresentam risco de contrair a doença e 1 a 2 milhões de novos casos ocorrem todo ano, os casos estipulados são de 1 a 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar e de 500.000 viscerais anuais (Longo *et al.*, 2013; Who, 2014).

A terapia desta zoonose por muito tempo é um desafio e isso se torna mais difícil pelo surgimento de resistência aos medicamentos (Stark *et al.*, 2016). O antimônio pentavalente foi introduzido no mercado a mais de 60 anos, e atualmente é a mais recomendada e utilizada terapia para o tratamento das leishmanioses (Croft, *et al.*, 2006; Chawla e Madhubala, 2010; Haldar, *et al.*, 2011). Expostos estes fatos, fica claro a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com ação antileishmania, visto a situação insatisfatória dos medicamentos no mercado, e as plantas medicinais brasileiras pela sua flora, têm grande potencial para suprir esta carência mundial.

Extrações por fluidos supercríticos são extrações consideradas verdes que se destinam a proteger o meio ambiente por não utilizar solventes orgânicos danosos (Atkins e Jones, 2011). Vindo a somar em um planeta cada vez mais sustentável. Já os sistemas de liberações de fármacos modificados têm vantagens tais como não oxidação e proteção das partículas, uma liberação mais prolongada e contínua com duração aumentada do efeito desejado (Emeje *et al.*, 2012).

O gênero *Pterodon* contém cinco espécies nativas brasileiras: *Pterodon abruptus* Benth., *P. apparicioi* Pedersoli, *P. polygalaeiflorus* Benth., *P. emarginatus* Vog. e *P. pubescens* Benth. Na qual a infusão hidroalcoólica dos frutos são utilizadas com propriedades antirreumáticas (Coelho *et al.*, 2001), analgésicas e anti-inflamatórias (Coelho *et al.*, 2005). Os mesmos são ricos em derivados de geraniogeraniol (cerca de 60%) (Mahajan e Monteiro, 1973), os quais têm atividade antileishmania

comprovada (Lopes *et al.*, 2012). Estudos com óleos essenciais e frações de frutos *P. emarginatus* relataram o potencial efeito antileishmania (Dutra, Pittela *et al.*, 2009). No entanto, visto que a atividade dos extratos dos frutos de *P. pubescens* ainda não havia sido investigada, e ao grande potencial que os frutos da espécie apresentam (o potencial), vimos como necessário o desenvolvimento e realização deste trabalho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEISHMANIOSES

#### 2.1.1 Características gerais

Classificação taxonômico

Reino: Protista

Sub-reino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Subfilo: Mastigophora

Classe: Zoomastigophora

Ordem: Kinetoplastida

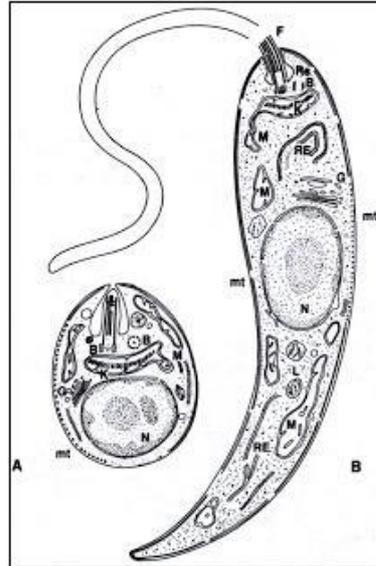
Família: Trypanosomatidae

Gênero: *Leishmania*

Fonte: Mukbel, 2005.

Leishmaniose é a uma doença humana parasitária, e desde 1903 é conhecida, sendo uma zoonose complexa transmitida por um inseto vetor e causada por 20 diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Coelho e Carvalho, 2005; Goodman *et al.*, 2005). Morfologicamente semelhantes sendo diferenciadas apenas por métodos bioquímicos, imunológicos ou patológicos (CDC, 2014). São classificadas pela sua origem geográfica, características ecológicas ou tendência de causar leishmania visceral, cutânea ou mucocutânea (Reithinger, *et al.*, 2007; Oryan, 2015; Rogers, 2012).

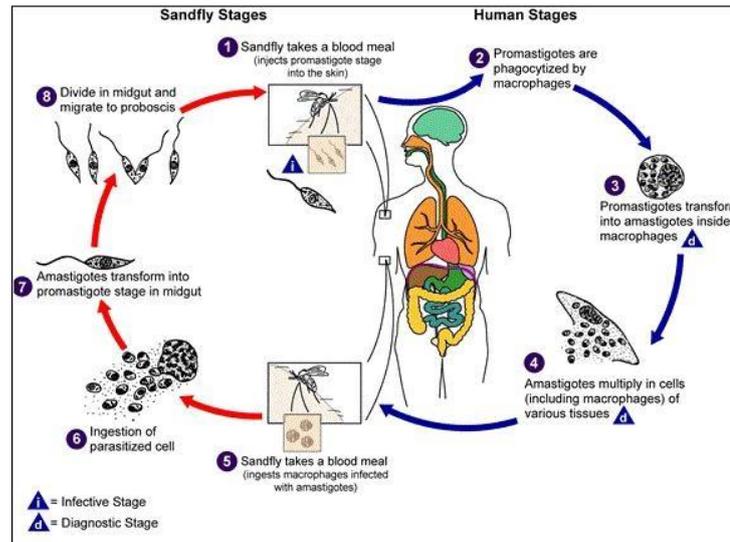
As formas redondas ou ovais amastigotas imóveis (fig. 1 a) medem aproximadamente de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e contêm em sua estrutura um núcleo grande e arredondado, cinetoplasto em forma de um pequeno bastonete, um flagelo interno visível em microscopia eletrônica e alguns vacúolos (Dedet, 2002). Em sua forma longa e delgada promastigota (fig. 1 b) tem aproximadamente de 15 a 30 por 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentando um núcleo central, cinetoplasto e um longo flagelo anterior, que apresenta medidas iguais ou superiores ao corpo da forma do protozoário (Neves *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Estrutura e características da forma amastigota intracelular (a) e promastigota (b) de leishmania. Fonte: Rey, 2008.

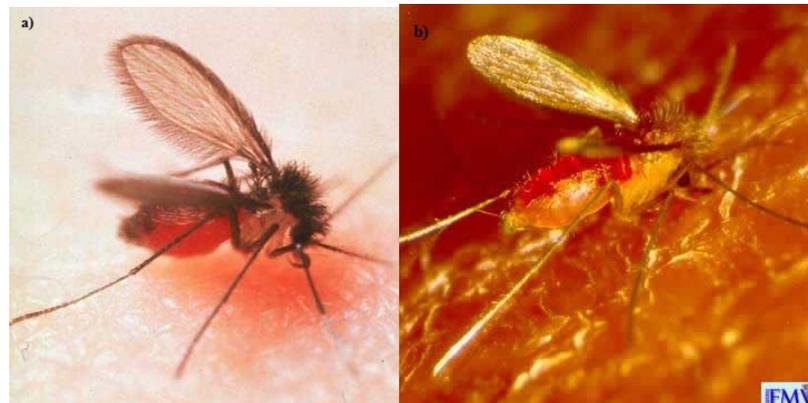
O parasito é dimórfico com ciclo heteroxênico (fig. 2), no qual inicia-se com o vetor infectado que ao alimentar-se injeta formas infectantes promastigotas no hospedeiro intermediário (fig. 2 - etapa 1) (Lessa, *et al.*, 2007; Vermelho, *et al.*, 2014). De acordo Panizzi e Parra (2012), os mosquitos do gênero *Lutzomyia* regurgitam em uma picada cerca de 100 unidades de promastigotas. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos, no qual ocorre a transformação em amastigotas (fig. 2 - etapa 2 e 3), seguida da sua multiplicação, pela divisão binária simples (fig. 2 - etapa 4) (Neves *et al.*, 2011; CDC, 2014). Esta multiplicação acontece ativamente e rapidamente, causando lesões teciduais (Zeibig, 2014). A fase amastigota é resistente ao ambiente ácido e hostil do macrófago, levando a ruptura e infecção de outros. Os macrófagos exibem uma capacidade diminuída de iniciar e manter uma resposta depois de infectado, proporcionando um local seguro para o parasito. A capacidade de controlarem a proliferação ou de sucumbirem depende de fatores como a virulência da espécie infectante e resposta imunológica (Camargo e Barcinski, 2003; Behrman *et al.*, 2005; Picon *et al.*, 2010).

Na etapa 5 e 6 (fig. 2) ocorre a infecção de um novo inseto vetor, ao se alimentar com sangue do hospedeiro contaminado, que tenha ingerido formas amastigotas. Na etapa 7 e 8 as amastigotas são diferenciadas em promastigotas na luz do tubo digestivo, e ocorre a multiplicação seguida da migração para a probóscide do inseto, e um novo ciclo recomeça (Rey, 2005; CDC, 2014). Segundo Kayser (2005), em temperaturas tropicais esse processo leva em média de 8 dias. Bowman (2010) afirma que a migração das formas promastigotas para o aparelho sugador do inseto, impede que o mesmo se alimente, deixando-os famintos e fazendo assim um maior número de hematofagia, contaminando um maior número de hospedeiros.



**Figura 2.** Ciclo da doença leishmaniose, utilizando o humano como reservatório hospedeiro. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014.

Os insetos vetores são dípteros da subfamília Phlebotominae, no Velho e no Novo Mundo esses flebotomos pertencem aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (fig. 3), respectivamente (Arruda, 2014; Stark *et al.*, 2016). Eles são conhecidos popularmente como *mosquito-palha*, *Birigui* e *Tatuquira* (Rivitti, 2014). E segundo Behrman *et al.* (2005), acredita-se que existem 30 espécies de insetos vetores desta zoonose.



**Figura 3.** Fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* (a) e *Phlebotomus* (b) vetores das leishmanioses se alimentando. Fonte: (Zoonosi, 2014).

Os microrganismos são transmitidos apenas por fêmeas infectadas que são hematófagas, os machos se alimentam de seiva. Os flebotomíneos são mais ativos do anoitecer, ao amanhecer e durante o dia ficam abrigados de predadores e do vento (Desjeux, 2004). Cães, cavalos e o homem geralmente servem como reservatórios desses patógenos, e os principais reservatórios silvestres são roedores, gambás, tamanduás, bicho preguiça, macacos, quatis, tatus e raposas (Baran e Nakamura, 2012; Rivitti, 2014).

De acordo com a Fiocruz (1997) a leishmaniose tegumentar é particularmente a mais importante na América do Sul, tendo ocorrência desde o México até o norte da Argentina. A doença apresenta alta

incidência em algumas regiões, principalmente do Brasil e Peru. E está ligada a mudanças ambientais, como desmatamento para a agricultura e silvicultura, construção de barragens e sistemas de irrigação (Coelho e Carvalho, 2005).

Para Amato et al. (2008) a leishmaniose causa significativa mortalidade e morbidez na população mundial, sendo considerada um sério problema de saúde pública (Gontijo e Melo, 2004; Chawla e Madhubala, 2010). Um total de 98 países nos cinco continentes relataram casos de leishmanioses (Alvar *et al.*, 2012). A doença apresenta-se clinicamente sob duas formas, a leishmaniose visceral (LV, também conhecida como Calazar) e leishmaniose tegumentar americana (LTA), que é subdividida em leishmaniose cutânea (difusa e localizada) e mucocutânea (LMC) (Reithinger *et al.*, 2007; Ngure *et al.*, 2009).

#### 2.1.1.1 Leishmaniose Visceral (Calazar)

É popularmente conhecida como “*Calazar, esplenomegalia tropical ou febre Dundun*”. Duas espécies de protozoários são responsáveis pela LV, *L. donovani* na Índia, oeste africano e Península Árabe, e o *L. infantum* no mediterrâneo, Ásia Central e nas Américas (Gramiccia, 2011).

Segundo Camargo e Barcinski (2003), é uma das formas mais graves de leishmaniose, no qual depois de inoculada na pele os protozoários acabam chegando aos fagócitos monucleares do baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea (Rang *et al.*, 2015). É a forma mais rara caracterizada por pápulas, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas na pele e não se observa ulcerações. É denominada forma anérgica da LTA, pois existe intenso parasitismo, com nenhuma ou pouca resposta inflamatória nas lesões (Lopes, 2006). O período de incubação é de 2 a 6 meses, e entre os sintomas incluem a febre que é intermitente e irregular associada a tremores e calafrios, debilidade, perda de peso, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia e linfadenopatia (Camargo e Barcinski, 2003; Gramiccia, 2011; WHO, 2014). De acordo Tortora *et al.* (2010), após o acometimento do rim, a função deste geralmente é perdida. Se não forem tratadas é quase sempre fatal, de 90% dos casos em 2 anos de doença, e atualmente continuam completamente incuráveis (Coelho e Carvalho, 2005; Gramiccia, 2011; WHO, 2014).

Mais de 90% dos novos casos ocorrem em: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão, representado na figura 4, pag. 26 (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2014). Para Ruza, (2003), os casos mundiais de LV vêm aumentando nas últimas décadas devido ao alguns fatores, como aumento de coinfeção por HIV em adultos.

## 2.1.1.2 Leishmania Tegumentar Americana

### 2.1.1.2.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

#### 2.1.1.2.1.1 Cutânea Localizada (LCL)

Em alguns lugares este tipo de leishmaniose é conhecida como “*Chaga oriental, úlcera de Bauru, nariz de tapir, botão do oriente, ferida brava*”, causada pela *L. tropica* e sua incubação é de semanas a meses (Tortora *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011). A leishmaniose cutânea é definida com lesões exclusivamente na pele, que inicia-se no ponto de inoculação das promastigotas através da picada do inseto. A lesão primária é única na maioria das vezes, embora eventualmente múltiplas picadas dos flebotomíneos ou disseminação hematogênica possam aumentar as lesões (Lopes, 2006). A primeira manifestação clínica é uma pápula eritomatosa que progride lentamente para um nódulo, após evolui para uma úlcera chamada de “*chaga oriental*” com bordas elevadas endurecidas (Gramiccia, 2011; Rang *et al.*, 2015).

Segundo Coelho e Carvalho (2005) as úlceras podem ser agravadas por infecções secundárias. O quadro é assintomático na maioria dos casos, essas lesões podem terminar em uma regressão espontânea em alguns meses, resultando em cicatrizes (Behrman *et al.*, 2005; Gramiccia, 2011), ou permanecem como lesões ulceradas por longo período (Lopes, 2006), que são geralmente redondas ou ovadas com dimensões de 0,5 a 10 cm de diâmetros (Gramiccia, 2011).

Essa zoonose é causada pelas espécies *L. major*, *L. mexicana*, *L. peruviana* e *L. braziliensis* (Gramiccia, 2011). A doença por *L. tropica* pode envolver leishmaniose recidivante, desenvolvendo novas pápulas escamosas (Longo *et al.*, 2013). Cerca de 95% dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LTA ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Ira, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru, figura 4 pag. 26 (Alvar *et al.*, 2012).

#### 2.1.1.2.1.2 Cutânea Difusa (LCD)

É uma das formas raras de infecções dérmicas, remotamente encontradas na Etiópia, África Oriental e Américas Central e do Sul. Inicia-se com um único nódulo na pele que se dissemina por todo o corpo (Satish e Sahoo, 2010). Esses nódulos são repletos de parasitos que não ulceram (Habif, 2012). A multiplicidade das lesões é o resultado de metástases do parasito de um sítio para outro, através dos vasos linfáticos ou da migração de macrófagos parasitados (Neves *et al.*, 2011).

É uma variante progressiva crônica, que se desenvolve no contexto de leishmaniose anergia (Satish e Sahoo, 2010). Esta forma clínica esta associada a uma resposta defasada a antígenos do sistema imunológico. A doença se caracteriza por curso crônico e progressivo, não respondendo aos tratamentos. Cerca de 40% dos pacientes parasitados por *L. amoenensis* desenvolvem LCD (Neves *et al.*, 2011).

#### 2.1.1.2.1.2.1 *Leishmania amazonensis*

Originalmente descoberta na região amazônica por isso de seu nome científico, esta forma mostra uma vasta distribuição nos países da América do Sul como Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Panamá e Venezuela (Gramiccia, 2011).

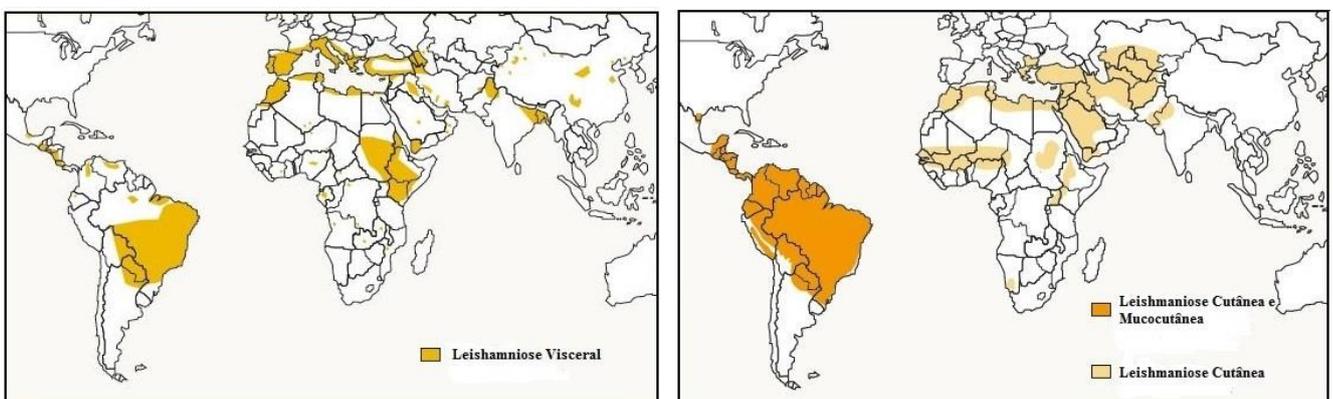
No Brasil os ciclos de transmissão da *L. amazonensis* ocorrem em áreas primárias e secundárias da Amazônia e nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná (Brasil, 2014). Os principais reservatórios naturais para esta espécie de leishmania são roedores silvestres como o *Proechymis "rato soia"* e o *Oryzomys*, como secundários marsupiais. E seu principal vetor na transmissão desta zoonose na região é o *L. flaviscutellata* (Brasília, 2000; Gramiccia, 2011).

As manifestações clínicas que esta espécie produz ao homem são normalmente lesões ulceradas localizadas contendo numerosos parasitas nas bordas (Neves *et al.*, 2011, Brasil, 2014).

#### 2.1.1.2.1.3 Leishmaniose Mucocutânea (LMC)

Conhecida assim, pois além da pele afetada é encontrada nas membranas mucosas. Causada pelas espécies *L. braziliensis* e ocasionalmente por *L. panamensis*. Pode acometer lesões cutâneas concomitante com mucosas, ou somente mucosas. A forma mucosa ocorre em intervalos de meses a anos após a lesão cutânea inicial (Tortora *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011). Na maioria dos casos a LMC acomete inicialmente os tecidos frouxos com cartilagem do septo nasal, seu curso é variável podendo ficar como granuloma latente e perfurar o septo nasal, deformando o nariz, a boca e obstrução das vias aéreas, até se disseminar para a região da nosofaringe e hipofaringe (Behrman *et al.*, 2005). De acordo com Zeibig (2014) edemas e infecções bacterianas secundárias, combinadas com numerosas lesões nas mucosas, podem causar a desfiguração da face, e até o óbito.

Quase 90% de todos os casos de leishmaniose mucocutânea estão agrupados na Bolívia, Brasil e Peru, figura 4, pag. 26 (WHO, 2014). Dados convergentes aos de Habif (2012), no qual relata raridade de casos de LMC fora da América Latina.



**Figura 4.** Mapa de distribuição geográfica da ocorrência de leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea. Fonte: (DNDI, 2012).

### 2.1.2 Tratamento das Leishmanioses

Geralmente as leishmanioses do velho mundo tendem a apresentar cura espontânea, em comparação as do novo mundo que necessitam de tratamento sistêmico. As opções de tratamento são limitadas e longe de serem satisfatórias (Del Pino, 2013), além de não apresentar nenhuma vacina comprovada contra a doença em humanos, atualmente existem pesquisas para seu desenvolvimento (Desjeux, 2004). No Brasil já foram desenvolvidas vacinas para a prevenção de leishmania visceral canina (Zeibig, 2014). Existe um pequeno número de fármacos para o tratamento, ainda que os fármacos disponíveis possam ter complicações como variações da suscetibilidade e farmacocinéticas, na interação fármaco e sistema imunológico do hospedeiro, além de toxicidade (Murray *et al.*, 2015).

Para o tratamento dispõem de antimoniais pentavalentes: estibogliconato de sódio e o antimonioto de meglumina (tóxicos e com crescente resistência do parasito) que são os fármacos de primeira escolha. Antifúngicos poliênicos a anfotericina B, azólicos a cetonazol, itraconazol, fluconazol, e por fim miltefosina e pentamidina, que são os de segunda opção, principalmente no caso de resistência aos fármacos de primeira escolha (Croft *et al.*, 2005; Croft *et al.*, 2006, Ruiz e Guillén, 2006, Rang *et al.*, 2015). A resistência das leishmanias poderia ser explicada pela persistência do parasito em certos hospedeiros mesmo na presença da resposta imunológica, mediada por células e fatores humorais (Grimaldi Júnior, 1982). De acordo com Tourinho (2015), o sucesso no tratamento da leishmaniose vai além de melhorar a toxicidade de drogas existentes, e também melhora na qualidade assistencial e estrutural dada aos pacientes que são tratados, contribuindo para diminuição de óbitos por esta doença. Para Pelissari *et al.* (2011), no Brasil uma parcela considerável de tratados estão recebendo prescrição de forma inadequada, dificultando o tratamento, e a qualificação do profissional médico para o manejo desses pacientes são necessários.

Para Soares-Bezerra *et al.* (2004) o fato da interação leishmania-hospedeiro possuir vias metabólicas semelhantes, faz com que ocorram possíveis adaptações, causando a sobrevivência dos protozoários. O sistema imune é ativado após a infecção, e passa a responder ativamente na tentativa de eliminar o parasito, no entanto os protozoários utilizam mecanismos como inativação do sistema complemento modulando citocinas e quimiocinas, e até interferindo nos processos de migração apoptótica, dificultando processos normais de manutenção do sistema imune (Castellano, 2005).

#### 2.1.2.1 Antimoniais

O antimônio é um metaloide, cuja sua aplicação terapêutica, iniciou-se em 1906, quando o tártaro emético passou a ser utilizado na tripanossomiose africana. No Brasil Gaspar Viana em 1912, começou a utilizá-lo com sucesso no tratamento da LTA e posteriormente na LV (Auto *et al.*, 2008).

O Antimoniato de N-metil glucamina, “glucantime”, foi introduzido por Durand e colaboradores em 1946, sendo um fármaco administrado via parenteral, apresentando uma baixa toxicidade, sendo seguro e eficaz (Goodman *et al.*, 2005). Esse grupo de fármacos é mundialmente

utilizado devido ao seu baixo custo e por ter sobrevivido ao longo dos anos (Kasper e Fauci, 2015), exceto na Índia no qual a eficácia do estibogliconato de sódio diminui (Katzung *et al.*, 2013). No Brasil o mesmo mostrou-se com alta resistência e efeitos colaterais adversos quando tratados leishmania do complexo *L. braziliensis* (Zeibig, 2014). O uso oblíquo deste agente tem sido ameaçado pelo desenvolvimento de resistência do parasito. Este fármaco trata a forma grave e avançada da doença, e exibi dificuldades de ser empregado, registrando-se elevações dos resíduos nitrogenados e exacerbação hemorrágica (Barros E e Barros H, 2010; Murray *et al.*, 2015).

No mecanismo de ação destes fármacos ocorre uma bioedução para a forma trivalente Sb (III), que inibe a tripanotona reductase, enzima envolvida no controle do estresse oxidativo das leishmanias (Kasper e Fauci, 2015). Alguns autores sugerem que eles atuam estimulando o sistema imunológico do hospedeiro (HO) (Auto *et al.*, 2008). Este fármaco é indicado para todas as formas de LTA, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de reincidência (Brasília, 2000). Há evidências sobre a relação entre o sucesso da terapia e o estado imunitário do doente, o glucantime não agirá se não, nos casos em que o macrófago esteja ativado e a defesa do paciente começando, no qual pacientes imunodeprimidos em geral são refratários ao tratamento (Katzung *et al.*, 2013).

#### 2.1.2.2 Anfotericina B

O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade antileishmania, sendo considerada um fármaco secundário devido a sua toxicidade, porém, devido às melhorias nas formulações e nos esquemas de dosagem, vem sendo reavaliado e aproveitado (Brasília, 2000; Goodman *et al.*, 2005). É um reforço útil no caso de resistência, e pacientes que não conseguem tolerar os tratamentos prolongados via parenteral e que não respondem ao tratamento dos antimonias (De Lucia, 2008; Rang *et al.*, 2015).

Segundo Barros E, e Barros H, (2010) a anfotericina B apresenta atividade limitada contra *L. braziliensis* e *L. donovani*. Seu mecanismo de ação não é ainda totalmente esclarecido, mas apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática dos protozoários (Brasília, 2000; De Lucia, 2008; Ruiz e Guillén, 2006). Os diversos relatos na literatura de alternativas quimioterápicas são, por exemplo, a utilização de anfotericina B associadas a moléculas de colesterol ou lipossomas, capazes de alcançar os órgãos infectados com grande eficácia, no caso de LV (Castro, 2011). A anfotericina B lipossomal, tem ótimos efeitos, porém, sem preço acessível (DNDI, 2012).

#### 2.1.2.3 Pentamidinas

É uma diamina aromática que é administrada via parenteral. Este fármaco é utilizado como uma alternativa no tratamento de LV, quando os antimonias não produzem efeitos satisfatórios. Pelo fato de

não ser bem absorvida oralmente, sua administração é realizada pela intravenosa ou intramuscular (Ruiz e Guillén, 2006), as pentamidinas foram consideradas como fármacos secundários devido a sua alta toxicidade (Goodman *et al.*, 2005). São utilizados em casos em falha terapêutica ou em pacientes com contra indicações com fármacos de primeira escolha (Bogotá, 2010). O mecanismo de ação deste fármaco, não é todo compreendido, mas acredita-se inibir a ação da RNA polimerase, interferindo na função ribossomal, síntese de ácidos nucleicos inibindo a replicação dos microrganismos (Fiocruz, 1997).

#### 2.1.2.4 Miltefosina

Miltefosina é um análogo de fosfocolina oral, é um fármaco considerado de nova linha em experimentação, que foi desenvolvido inicialmente para o tratamento de câncer. Foi o primeiro medicamento oral registrado, contudo é caro, contra indicado para grávidas por ser teratogênico, apresentar meia-vida longa (200 h) e causa preocupação pelo possível surgimento de resistência (Satish e Sahoo, 2010; DNDI, 2012; Magill *et al.*, 2013). Com ação comparável a anfotericina B no tratamento de LV na Índia, no qual prevalecem casos de resistência a antimonias. Sua atividade é atribuída à interação com as vias de tradução de sinais celulares e inibição da biossíntese de fosfolipídios e esteróis. A eficácia no curso de tratamento é de 28 dias (Kasper e Fauci, 2015). Entre os efeitos adversos ocorrem vômitos e diarreia em 60% dos pacientes tratados (Seth S. e Seth V, 2009).

A droga é ativa contra cepas de *L. donovani* resistentes e sensíveis aos antimoniais, e tem apresentado uma taxa de 97% de cura em pacientes com LV (Murray *et al.*, 2015). A miltefosina se mostrou ativamente semelhante ao N-metil glucamina no tratamento da LC experimental causada por *L. amazonensis* em camundongos, possibilitando de sua experimentação em ensaios clínicos (Campos, 2008; Costa Filho *et al.*, 2008).

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS

São considerados princípios ativos todas as substâncias ou o conjunto delas, quimicamente bem definidas e responsáveis pela ação farmacológica do material vegetal (Oliveira *et al.*, 1998). Esses princípios ativos são moléculas chamadas de fitofármacos, no qual alguns são diretamente preparados em medicamentos, ou previamente purificados (Brandão, 2009). A planta medicinal constitui uma unidade terapêutica e todos os princípios ativos formam um fitocomplexo que interage entre si e com outras moléculas, ou seja, ele representa a unidade farmacológica total da planta (Jorge, 2009). A ação farmacológica é graças a estes princípios ativos, sejam eles o conjunto ou a unidade destas substâncias químicas (Oliveira *et al.*, 1998). Sendo produzidas pelos metabolismos primários ou secundários dos vegetais (Campos, 2008).

No Brasil, um grande número de espécies de plantas é utilizado sem a comprovação científica, apenas pelo conhecimento da tradição. Estima-se que 70% dos medicamentos foram desenvolvidos, com base na cultura folclórica dos povos (Santos *et al.*, 2012). Outro problema no país é o consumo de plantas nativas sem o uso sustentável, causando algumas perdas à biodiversidade, devido à falta de reimplantação de uma nova unidade da espécie na natureza (extrativismo) (Oliveira *et al.*, 1998).

### 2.2.1 Metabolismo vegetal

Todos os organismos precisam produzir e transformar compostos químicos que o fazem sobreviver, crescer e reproduzir-se (Dewick, 2013). As plantas mostram uma grande variação genética no metabolismo vegetal, e são essas reações bioquímicas inter-relacionadas que mantêm a vida (Smith *et al.*, 2010). Os produtos naturais são compostos orgânicos formados por sistemas vivos, e as plantas sintetizam uma grande variedade desses compostos que são classificados como metabólitos primários ou secundários (Hanson, 2003). Os compostos primários desempenham papéis essenciais associados ao metabolismo e a reprodução das células, como fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento destacando-se a produção de aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, carboidratos, açúcares, lipídeos e proteínas (Neto e Caetano, 2005; Taiz e Zeiger, 2013).

Os metabólitos secundários não estão ligados diretamente a processos fisiológicos normais das plantas, desta forma estes são definidos como estruturas complexas, biologicamente ativas e encontradas em baixas concentrações (Neto e Caetano, 2005). São compostos característicos restritos de uma espécie ou de grupos taxonômicos relacionados. Eles não são necessariamente produzidos sob todas as condições, dependentes da quantidade de luz, nutrientes e água que a planta receberá (Croteau *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2010; Dewick, 2013). Há interesse científico nestes compostos, por apresentarem efeitos biológicos em outros organismos (Hanson, 2003), apresentando um papel-chave na proteção das espécies contra ação de herbívoros, infecções microbianas, atrativos para polinização, agentes alelopáticos, e protetores UV. Estima-se que existem mais de 300.000 metabólitos secundários (Mcmurry, 2014). Esses compostos são também de interesse devido à sua utilização como corantes, fibras, colas, ceras, óleos, agentes aromatizantes e perfumes, e como potenciais fontes de novos medicamentos naturais, antibióticos, inseticidas e herbicidas (Crozier *et al.*, 2008). Os metabólitos secundários possuem larga ubiquidade, bem como diversas atividades biológicas. Essas substâncias pertencem a diferentes classes químicas, o que aumenta a probabilidade de descoberta de novos agentes terapêuticos (Corrêa *et al.*, 2008).

Atualmente existe uma enorme flora inexplorada, com diversidade química imensurável. Tais compostos garantem a sobrevivência sobre intensa competição, princípios ativos estes, que podem ser empregados no tratamento e cura de doenças que atualmente são incuráveis (Maroni *et al.*, 2006).

## 2.3 BIOATIVIDADES

### 2.3.1 Na família Fabaceae

Dentre as espécies vegetais da família Fabaceae que apresentaram alguma atividade biológica contra leishmania encontram-se: o extrato etanólico de *Crotalaria barbata*, *Desmodium gangeticum* com seu extrato metanólico das folhas e *Periandra mediterranea* com sua fração saponinínica obtida das raízes, ambas apresentaram atividade contra *L. donovani* (Iwu *et al.*, 1992; Singha *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1997). *Spartium junceum* apresentou atividade contra *L. major* com os extratos dos ramos da espécie (Schlein e Jacobson, 1994).

Segundo Santos *et al.* (2008), o óleo da *Copaifera reticulata* apresentou atividade antiprotozoário contra *L. amazonensis* com CI de 5, 15 e 20 µg/mL contra promastigotas, amastigotas axenicas e amastigotas intracelulares, respectivamente.

### 2.3.2 No gênero Pterodon

O extrato etanólico das folhas de *P. emarginatus* foi avaliado pelo seu potencial efeito antioxidante, toxicidade em naúplios de *Artemia salina* e atividade antileishmania em formas promastigotas de *L. infantum chagasi*. Os resultados obtidos foram de alta concentração de fenóis totais, porém com baixa atividade antioxidante quando comparada com o padrão quercetina; a toxicidade contra *A. salina* apresentou um CI<sub>50</sub> 167,3 µg/mL e moderadamente ativo contra formas promastigotas *L. infantum*, com um CI<sub>50</sub> 49,65 a 100 µg/mL (Cavalcante *et al.*, 2014).

Para Da Silva *et al.* (2005), o extrato bruto *P. emarginatus* obtido por soxhlet com o solvente acetato de etila, apresentou uma significativa atividade na inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos, entre eles *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* e no crescimento de algumas fitobactérias.

Pimenta *et al.* (2006) avaliaram em um estudo o efeito larvicida dos extratos hexânico e metanólico dos frutos de *P. polygalaeflorus* contra larvas de *A. aegypti*. A fração metanólica não apresentou atividade, porém quando isolou da fração o diterpeno furânico 6- $\alpha$ -acetioxivouocapano, apresentou uma atividade de CL<sub>50</sub> 186,21 µg/mL. Os resultados apontam *P. polygalaeflorus* como uma espécie promissora para o desenvolvimento de novas drogas com o efeito larvicida.

Dutra, Braga *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana e antileishmania do óleo essencial de sementes *P. emarginatus*, apresentando contra *Staphylococcus aureus* uma leve atividade com média de halos de inibição de 10 mm. Frente aos protozoários apresentou um CI<sub>50</sub> 46,65 e 50,06 µg/mL para as frações hexânica e butanólica, respectivamente, frente a *L. amazonensis*, e ineficaz para *L. chagasi*. Santos *et al.* (2010), realizaram um estudo com óleo essencial de folhas de *P. emarginatus* com propriedade antimicrobiana. Seus resultados mostraram a inatividade antifúngica do óleo mostrando-se moderadamente eficaz apenas contra bactérias Gram positivas, com concentrações

inibitórias mínimas (CIM) que variaram de 50 ao 0,78 mg/mL. O extrato etanólico bruto do pó da casca de *P. emarginatus* se mostrou eficiente contra 24 espécies de bactérias Gram positivas e negativas, esporuladas e não esporuladas e ao fungo *Candida albicans* (Bustamante *et al.*, 2010). O extrato apolar de *P. emarginatus* apresentou uma atividade repelente contra fêmeas de insetos *A. aegypti* por um período de 8 horas na dose 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, e a uma dose quatro vezes superior com o extrato etanólico (Teixeira, 2003).

De acordo com Dutra, Pittella *et al.* (2009) o óleo essencial e a fração hexânica de sementes de *P. emarginatus* apresentaram efeito cicatrizante da pele de coelhos, submetidos a úlcera cutânea. Dutra (2008) obteve resultados positivos quando avaliou atividade antinociceptiva em camundongos pelo óleo essencial e três frações das sementes de *P. emarginatus*. Ambos apresentaram atividade antinociceptiva periférica e central nas concentrações testadas, porém a fração hexânica juntamente com o óleo essencial, apresentaram os melhores resultados nos modelos analisados.

### 2.3.2.1 Bioatividade dos compostos isolados

#### 2.3.2.1.1 Geranilgeraniol

Em um estudo no qual se avaliou o efeito do extrato bruto e de frações provenientes de sementes de *P. pubescens* Benth., demonstrou um efeito lítico dose-dependente sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O extrato e frações causaram várias alterações em mitocôndrias e rompimento na cadeia de DNA. Uma subfração da fração hexânica apresentou a melhor atividade, com a presença do composto majoritário geranilgeraniol em sua composição (Menna-Barreto *et al.*, 2008).

O composto geranilgeraniol foi isolado de sementes de *P. pubescens* apresentando atividade antinociceptiva quando administrados via oral e sistêmica em camundongos, no qual reduziram as contorções abdominais (Spindola *et al.*, 2010).

Segundo Lopes *et al.* (2012) geranilgeraniol, composto majoritário isolado da espécie *Bixa orellana* demonstrou atividade inibitória das formas promastigota e amastigota intracelular com CI<sub>50</sub> 11 e 17,5 µg/mL em *L. amazonensis*.

#### 2.3.2.1.2 Epoxi-geranilgeraniol

Mors *et al.* (1967) e Santos Filho *et al.* (1987), demonstraram em seus respectivos trabalhos que o diterpeno 14,15-epoxigeranilgeraniol presente no óleo dos frutos de *P. pubescens* foi ativo inibindo a penetração da larva cercaria de *Schistosoma mansoni* em camundongos.

Hansen (1991) relatou o primeiro trabalho demonstrando atividade antifúngica do diterpeno 14,15-epoxigeranilgeraniol proveniente dos frutos de *P. emarginatus*, frente aos microrganismos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Em uma avaliação da atividade antitumoral em glioblastomas humanos (U87MG) as frações hexânica, diclorometano e etanólica dos frutos de *P. emarginatus*, apresentaram uma inibição de menos de 50% da proliferação celular tumoral, na concentração de 10 mg/mL. Duas subfrações isoladas da fração hexânica, mostraram em sua constituição o diterpeno 14,15 epoxigeranilgeraniol, e uma nova avaliação da viabilidade celular foram tratadas com uma concentração de  $10^{-3}$  para  $10^3$  µg/mL, a fração hexânica e as duas subfrações apresentaram  $CI_{50}$  de 0,03; 4,62 e 9,70 µg/mL respectivamente (Hansen *et al.*, 2012).

### 2.3.2.1.3 Diterpenos furânicos vouacapanos

Em um estudo *in vitro* no qual se avaliou a atividade antitumoral, a subfração terpênica foi isolada das sementes de *P. pubescens*, denotando a presença do composto metil, 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapano-17 $\beta$ 'oato. Segundo os autores, a citotoxicidade para as células leucêmicas K562, que foram testadas foi concentração dependente, ocorrendo um aumento na morte celular das células tumorais leucêmicas quando tratadas com 30 µg/mL da subfração (29,5%) células tratadas. Por fim houve um aumento da apoptose celular de 26,7% com a subfração terpênica (Pereira M *et al.*, 2011).

Vieira *et al.* (2008) realizaram um estudo com as sementes de *P. pubescens* no qual avaliaram a eficácia do extrato etanólico bruto, das frações e subfrações com efeito antiproliferativo em células tumorais. Isolaram o furano diterpeno vouacapano 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 14 $\beta$ , 19-tetraol de uma das subfrações, e este composto isolado puro apresentou características típicas de apoptose nas células de melanoma (SK MEL37), com a fragmentação da membrana nuclear e do DNA.

Segundo Silva *et al.* (2004) a atividade anti-inflamatória aguda e tópico em edema induzido por carragenina, foi atribuída à presença do furano diterpeno metil 6,7-dihidroxivouacapano n-17 oate, presente em uma das subfrações do extrato oleaginoso dos frutos de *P. pubescens*.

Para Galceran *et al.* (2011), o composto químico isolado da fração hexânica dos frutos de *P. emarginatus*, ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oico, exibiu ação anti-inflamatória, inibindo os edemas provocados por carrageninas e prostaglandinas e com propriedades analgésicas.

De acordo com Coelho *et al.* (2005), uma fração isolada do extrato oleaginoso de *P. pubescens*, com a presença de derivados de vouacapanos, exibiu (uma fração isolada) efeito antinociceptivo periférico e central por diferentes mecanismos em camundongos machos. Os resultados obtidos por Taminato (2007), descrevem que a ação antinociceptiva de *P. pubescens*, não este apenas limitada aos compostos vouacapanos presentes na espécie. O autor fracionou duas frações do extrato bruto diclorometano dos frutos, uma com a presença dos compostos vouacapanos e outra com a ausência deste. A fração com os compostos apresentou uma boa atividade antinociceptiva, porém, a fração com a ausência destes compostos apresentou os melhores resultados. Estes resultados corroboram em parte com os encontrados por Spindola *et al.* (2010) no qual relatou a atividade antinociceptiva em modelo animal do composto isolado 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$  oato metil ester, em diferentes modelos e

vias de administração, o composto reduziu as contorções abdominais em camundongos. Para *Duarte et al.* (1992) o composto vouacapano 6 $\alpha$ -7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato reduziu a antinocicepção em testes de contorções em ratos, chegando a 91% com dose de 500  $\mu$ mol/kg via intraperitoneal, e na mesma dose 61% via subcutânea. Já na administração oral, nas doses de 250 e 500  $\mu$ mol/kg, causou uma inibição de 30,7 e 46%.

Compostos diterpenos furânicos isolados dos extratos das sementes *P. polyglaefflorus*, apresentaram atividade antilarvívica contra *A. aegypti*. Entre eles o ácido 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapan-17 $\beta$ -oico com uma concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) de 14,69  $\mu$ g/mL, superior ao de seus derivados (De Omena *et al.*, 2006).

A bioatividade dos compostos diterpenos furânicos isolados dos frutos *Stuhlmania moavi*, 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -diol; vouacapano -18, 19 -diol; 18-hidroxivouacapano 19-al foram ensaiados em avaliações antimicrobianas frente a sete microrganismos, entre eles constavam *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Penicillium notatum*. Todos os diterpenos furânicos se mostraram mais ativos na inibição frente as bactérias, comparando-os aos fungos analisados (Odalo *et al.*, 2009).

Desde a descoberta dos furanos diterpenos vouacapanos, como o ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$  dihidroxivouacapano-17 oico, serviu como molécula protótipo para diversos compostos com atividades variadas, no qual se acredita que a bioatividade das sementes do gênero *Pterodon* estejam diretamente relacionado com este constituinte (Dultra, 2008).

### 2.3.3 Na espécie *Pterodon pubescens* Benth

Hoscheid *et al.* (2013) obtiveram resultados promissores com a fração hexânica provenientes dos frutos de *P. pubescens*, reduzindo o volume e o exsudado da inflamação (250 e 500 mg/kg) induzidos por carragenina nas cavidades pleural em ratos. Além de diminuir os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicerídeos.

A atividade antiproliferativa *in vitro* dos compostos provenientes do óleo bruto das sementes de *P. pubescens* foi avaliada contra linhagens de células tumorais. Três compostos isolados (furanoditerpenos) mostraram-se como potenciais novos agentes contra células cancerígenas da próstata. O 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano, apresentou os melhores resultados, sendo 26 vezes mais potente comparado com o controle positivo (Doxorubicina) para inibir 50% do crescimento, 15 vezes mais citostático e 6 vezes menos tóxico (Spindola *et al.*, 2009).

Santos *et al.* (2011) não encontraram resultados promissores na ausência de atividade antimicrobiana do extrato aquoso e hidroalcoólico de *P. pubescens* frente a três microrganismos de ocorrência em humanos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Roque *et al.*, (2015), encontraram atividade antifúngica com um composto isolado dos frutos de *P. pubescens* com massa de 355 m/z contra algumas espécies de fungos como *C. albicans*.

Katz *et al.* (1993), avaliaram a incorporação do óleo essencial de frutos *P. pubescens* em sabonetes com propriedades quimioprofiláticas. Os resultados indicaram que os sabonetes com o óleo de *P. pubescens*, apresentaram proteção total, contra a penetração do parasito *Schistosoma mansoni*.

#### 2.3.3.1 Características gerais de *Pterodon pubescens* Benth.

Classificação taxonômica

Reino: Plantae

Divisão: Spermatophyta

Subdivisão: Angiospermas

Classe: Dicotyledoneae

Família: Fabaceae/(Leguminosae)

Gênero: *Pterodon* Vogel

Espécie: *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.

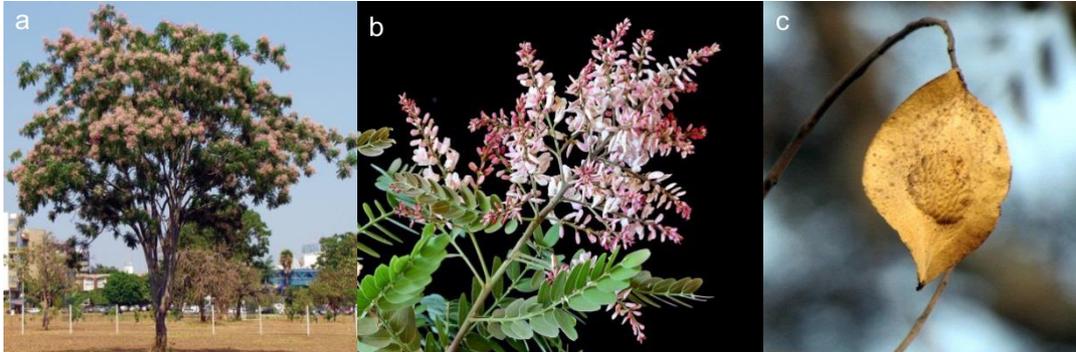
Fonte: Lorenzi (2008).

*Pterodon pubescens* (Benth.) é pertencente à família Fabaceae (leguminosae) e sua distribuição geográfica é restrita a América do Sul (Bisby, 1994). Popularmente a espécie é conhecida como “*Favero, Sucupira-Branca, Fava de sucupira e Sucupira-Lisa*” (Rizzini, 1985). Sua ocorrência abrange os estados brasileiros de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul, área do Cerrado até a transição para a floresta semidecídua da bacia do Paraná, na região central do Brasil (Oliveira Filho *et al.*, 2008).

É uma árvore arbórea que atinge cerca de 15 m de altura, possui tronco retilíneo e sua casca parda acinzentada é lisa nos exemplares mais jovens e levemente fissuradas nos mais desenvolvidos (Peixoto *et al.*, 2006). A copa é formada por folhas compostas de 20 a 30 folíolos arredondados, que oferecem boa sombra. As inflorescências são em panículas grandes desabrochando de maio a junho, pequenas flores de coloração rósea alva. Apresenta característica ecofisiológica de heliófila (Oliveira Filho *et al.*, 2008), sendo utilizado normalmente na arborização, paisagismo e na recomposição florestal (Lorenzi, 2008).

A maturação dos frutos de *P. pubescens* ocorre anualmente nos meses de junho a julho, consistindo em legumes sublenhosos, indeiscentes, contendo grande quantidade de óleo com odor forte, e que serve para propagação da espécie (Peixoto *et al.*, 2006). Os frutos são amplamente utilizados na medicina popular por conter grande quantidade de diterpenos lineares e/ou tetracíclicos solubilizados em substâncias lipídicas (Lorenzi, 2008; Lorenzi e Matos, 2008). De acordo com Botini *et al.* (2015), em um estudo etnobotânico, tanto frutos como as cascas de *P. pubescens* são usados como depurativo do sangue, o tratamento vermes, corrimentos fortes, reumatismo, infecções em geral, dores na coluna, úlceras e dores estomacais. A obtenção dos frutos pode ser realizada por coleta

diretamente nas árvores quando iniciada a queda espontânea ou por recolha no chão após a queda dos mesmos (Lorenzi, 2008).



**Figura 5.** Fotos de *Pterodon pubescens* Benth. a) árvore; b) enfloração; c) fruto. Fonte: Lorenzi & Matos, 2008.

## 2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÕES DE PLANTAS MEDICINAIS

A escolha do método para extração de plantas medicinais depende da natureza do material vegetal, da sua adaptabilidade a cada um dos vários métodos existentes, se a extração proporcionará o esgotamento total ou parcial da droga vegetal (Allen Jr *et al.*, 2013), dos equipamentos disponíveis no local de trabalho e da finalidade dos extratos. Os extratos obtidos das plantas através de métodos convencionais são relativamente impuros, sejam eles pós ou semi-sólidos que são destinados apenas para tratamento oral ou uso externo (Sapkale *et al.*, 2010). Já metodologias mais avançadas como as extrações supercríticas, são consideradas mais puras, por não necessitar de solventes orgânicos em sua obtenção, porém são técnicas que não são encontradas em todos os laboratórios devido sua alta taxa de implementação.

### 2.4.1 Maceração

O termo maceração vem do latim “*macerare*” significando embeber. É um processo em que parte do vegetal é embebido pelo solvente orgânico, até que o material seja amolecido e o solvente penetre nas estruturas celulares dissolvendo os solutos desejados (Zhang *et al.*, 2011; Allen Jr *et al.*, 2013). É um tipo de extração que estabelece um equilíbrio de concentração entre o material vegetal que será extraído e o solvente extrator (List e Schmidt, 1990).

É uma preparação realizada a frio em recipiente fechado, temperatura ambiente durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional ou mecânica constante (Melecchi, 2005). Comparado com outros métodos convencionais a intensidade de movimento é baixa, usando assim o termo condições estacionárias (List e Schmidt, 1990). Não conduz ao esgotamento total da droga vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (Miyake, 2006), por outro lado o fato de não utilizar temperaturas altas

nas extrações pode se conservar grande número de compostos no seu extrato, por exemplo, as substâncias voláteis.

É mais eficiente para matérias que contenham pouco ou nenhum material celular pelo fato das mesmas não serem rompidas no momento da extração (Allen Jr *et al.*, 2013), ou que não apresente nenhuma estrutura como gomas, resinas e alginatos, dificultadas nas extrações (Couto *et al.*, 2010). Porém é aplicável a todas as drogas que possuem substâncias ativas que são facilmente extraídas (Fonsêca, 2005). A técnica de maceração é fácil, porém consome bastante tempo em torno de dias, sendo menos eficiente, é adequada para compostos termolábeis (Liu, 2011), uma das desvantagens é a possível contaminação microbiana pela utilização de solventes com grande quantidade de água em sua constituição (Melecchi, 2005).

#### **2.4.2 Turboextração**

Também conhecida com “*turbólise*”, a extração normalmente é conduzida com solvente a frio (Couto *et al.*, 2010). É uma técnica que ocorre numa elevada velocidade de agitação, cerca de 5.000 rpm produzidas em um pequeno espaço, diminuindo o tamanho das partículas do material vegetal, destruindo assim zonas de concentração. A difusão de substâncias extrativas através das membranas das células é, em grande parte, substituída pelo fenômeno de lavagem a partir dos tecidos celulares destruídos (List e Schmidt, 1990). Esta técnica é agrupada dentro do grupo de métodos de maceração, e estabelece um equilíbrio de concentração entre o material vegetal que será extraído e o solvente orgânico extrator.

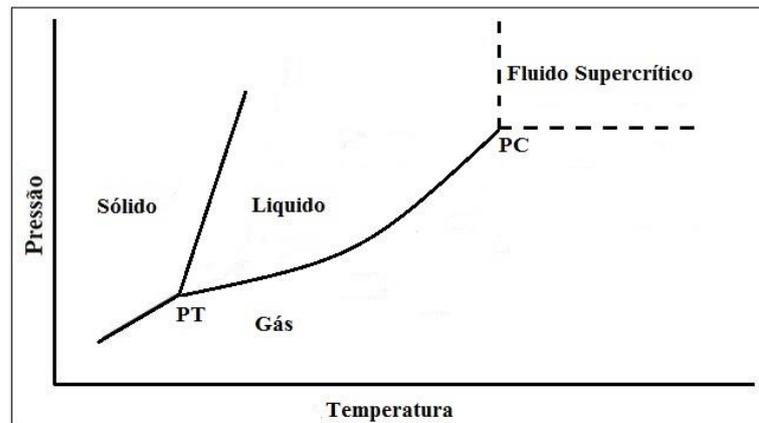
A redução do tamanho das partículas e o rompimento das células favorecem a rápida dissolução das substâncias, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e quase esgotamento total da droga, com uma economia considerável de tempo na extração (Miyake, 2006). É uma técnica adequada para extração de materiais vegetais grosseiros e duros, como cascas, raízes e sementes (Satish e Sahoo, 2010).

#### **2.4.3 Fluido Supercrítico-EFS**

Fluidos supercríticos são quaisquer substâncias a uma pressão e temperatura acima do seu ponto crítico termodinâmico (Velasco *et al.*, 2007). Seu nome vem do fato de extrair matérias sob condições críticas variando a temperatura e pressão. As primeiras patentes realizadas por fluido supercrítico surgiram no século 20 (Dariva e Oliveira, 2005), e atualmente é uma das técnicas com maior apelo sustentável em extrações de matérias vegetais.

As substâncias sob condições críticas são explicadas pela análise de um diagrama de fases para uma substância pura (Fig. 6), na qual os limites de gás-sólido correspondem a sublimação, do líquido-sólido a fusão e do gás-líquido a vaporização. As três curvas se cruzam e as três fases coexistem em

equilíbrio, conhecido como o ponto triplo, e sob essas condições que são realizadas as EFS (Knox, 2005; Jonin *et al.*, 2008; Dean, 2010).



**Figura 6.** Esquema de um diagrama de fases de uma substância pura. Notas: PT: Ponto triplo; PC: Ponto crítico. Fonte: Carrilho *et al.*, 2001.

A extração de substâncias a partir de produtos naturais é mais uma aplicação amplamente estudada de fluidos supercríticos com várias centenas de artigos científicos publicados (Reverchon e De Marco, 2006). O processo de extração consiste em uma corrente de fluido pressurizado, através de uma matriz sólida no qual está contido o material vegetal que será solubilizado e extraído pelos solventes (Costa, 2013). A extração supercrítica pode ser aplicada a compostos quimicamente estáveis principalmente a compostos de baixa polaridade, como substâncias voláteis, através de um gás inerte, uma vez que os mesmos são facilmente perdidos em métodos convencionais (Fonsêca, 2005; Wu *et al.*, 2012). Os EFS possuem densidade próxima a do líquido, e a viscosidade, difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos ao estado gasoso favorecendo o processo de extração (Antunes, 2007). Eles apresentam a propriedade de solvatação, que são paralelos aos solventes orgânicos, permitindo a dissolução de metabólitos nos vegetais (Queiroz *et al.*, 2001; Jonin *et al.*, 2008; Liu, 2011).

Pode-se conseguir uma maior seletividade na extração e obtem-se produtos mais puros escolhendo condições adequadas de pressão e temperatura, focando em um máximo rendimento. Os índices de recuperação são maiores que os das extrações convencionais e poluem menos o meio ambiente (Miyake, 2006). O fluxo de gás ocorre de forma cíclica, ocorrendo alternância entre as condições físicas dos gases (Fonsêca, 2005).

A tabela a seguir expõem os fluidos mais amplamente utilizados em EFS, com suas respectivas temperatura e pressão críticas.

**Tabela 1.** Tabela dos gases (fluidos) mais comumente utilizados nas EFS.

Fluido	Fórmula molecular	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (bar)
Nitrogênio	N <sub>2</sub>	-147,00	33,93
Metano	CH <sub>4</sub>	-82,49	46,40
Etileno	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	09,21	50,31
Dióxido de Carbono	CO <sub>2</sub>	31,30	72,90
Etano	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	32,25	48,83
Óxido nitroso	N <sub>2</sub> O	36,45	72,54
Hexafluoreto de enxofre	SF <sub>6</sub>	45,56	37,60
Propileno	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	91,60	46,10
Propano	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	96,85	42,55
Amônia	NH <sub>3</sub>	132,40	112,99
Dióxido de enxofre	SO <sub>2</sub>	157,50	79,84
Pentano	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	196,60	33,30
Água	H <sub>2</sub> O	374,40	226,80

Fonte: Maul, 1999; Carrilho et al., 2001.

Os fluidos supercríticos vêm ganhando cada vez mais espaço pela chamada “química verde”, não agredindo o meio ambiente com a utilização de solventes orgânicos (Atkins e Jones, 2011). Entre as vantagens, as EFS possibilitam a recuperação do solvente, apenas por ajustes na temperatura e pressão, podendo o mesmo ser continuamente reciclado. A eliminação de um dos processos mais desgastante nas extrações convencionais, que é a separação do produto extraído do solvente orgânico, minimiza os custos (Michielin, 2002; Reverchon e De Marco, 2006). A extração tem se tornado uma alternativa aos métodos de extração convencional, pelo seu grande poder de dissolução dos fluidos supercríticos, com ajustes das condições ótimas de extração (Díaz-Maroto *et al.*, 2002). Dentre as vantagens da EFS lista-se: os gases de extração com alta pureza, baixo custo toxicidade, reatividade, e são fisiologicamente seguros e inertes (Maul, 1999; Dean, 2010).

## 2.5 NANOEMULSÕES (NE)

Emulsões são sistemas farmacêuticos líquidos de um ou mais princípios ativos com duas fases envolvendo pelo menos dois líquidos imiscíveis e na qual um líquido é disperso na forma de pequenas gotas (fase interna) através de outro líquido (fase externa). Normalmente é estabilizada por meio de um ou mais agentes emulsificantes (Anvisa, 2010). As nanoemulsões são sistemas nanométricos heterogênicos e termodinamicamente instáveis, onde seu diâmetro médio das gotículas é inferior a 1000 nm em combinação com um tensoativo (Fast e Mecozzi, 2009; Pereira T, 2011; Thakur *et al.*, 2013). Estruturalmente de acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante elas podem ser divididas em dispersões líquidas de uma fase oleosa em uma fase aquosa, sendo fórmulas farmacêuticas tradicionais (Florence e Attwood, 2011; Devarajan e Jain, 2014).

Para o desenvolvimento das nanoemulsões são necessários forças energéticas ou potenciais químicos dos seus constituintes, sejam eles surfactantes ou outros (Abismail *et al.*, 1999). Estes sistemas são estabilizados cineticamente pela ação de sistemas tensoativos (moléculas anfífilas), que

são capazes de diminuir a tensão interfacial e formar um filme ao redor da gota da fase dispersa, com propriedades que estabilizam os sistemas (Pereira T, 2011). Contudo a estabilidade dependerá do tamanho das gotículas, das diferenças na densidade entre as fases, da viscosidade da fase externa e electrostática entre as gotas de repulsão (Abismail *et al.*, 1999).

Entre as aplicações se destacam o uso na medicina, com o desenvolvimento de NE com fins terapêuticos (Luz, 2014). Segundo Bagnato (2008) sistemas nanoestruturados são direcionados para áreas específicas do corpo, com alvos específicos de ação. Abordagens inovadoras na prevenção e tratamento de um amplo espectro de enfermidades, por exemplo, de doenças crônicas inflamatórias, cardiovasculares, infecciosas e cancerígenas. Com a diminuição do tamanho das partículas dos fármacos originais nos sistemas de liberações modificadas, tem um aumento no poder de penetração reduzindo potencialmente a toxicidade, assim elevando a biodisponibilidade e eficácia (Kuo, 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmania de extratos dos frutos de *Pterodon pubescens*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Otimizar um método extrativo a partir dos frutos de *P. pubescens*, que apresente a melhor atividade antileishmania *in vitro* frente a promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*

Caracterizar os extratos dos frutos de *P. pubescens* em cromatografia gasosa acoplado a um espectro de massas.

Formular um sistema de liberação de fármaco modificado (nanoemulsão), com o objetivo de melhorar a atividade antileishmania e diminuir a citotoxicidade dos extratos.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Fármacos, Solventes e Reagentes

Antibiótico gentamicina

Camundongos BALB/c

Cepa de promastigotas de *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/JOSEFA)

Corante Giemsa

DMSO (Dimetilsulfóxido)

Etanol grau analítico (Vetec<sup>®</sup>)

Etanol grau analítico (Química Fina<sup>®</sup>)

Formalina 3%

Hexano grau analítico (Synth<sup>®</sup>)

Lidocaína

Macrófagos J774A1

Meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA)

Meio Warren (Infusão de Cérebro e Coração “Difco<sup>®</sup>” + hemina + ácido fólico)

Miltefosina

PBS

Polietileno glicol (PEG 40H) óleo de rícino hidrogenado/oleato de sorbitano Oxiteno (SP Brasil)

Phospholipon<sup>®</sup> 90 G

Sal de tetrazólio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco)

Tiopental

#### 4.1.2 Equipamento, aparatos e acessórios

Agitador mecânico de maceração

Analisador de partículas (Beckman Coulter DELSATM Nano C, Fullerton, CA, EUA)

Aparato semicontínuo extração fluido supercrítico - módulo experimental construído no laboratório de tecnologia supercrítica da UEM

Banho ultra-som (XL200 Sonicator<sup>®</sup>)

Balança analítica (AY220 Shimadzu<sup>®</sup>)

Balança analítica (Marte AM-220)

Câmara de Newbauer

Centrífugada

Contador de células

Cromatógrafo Gasoso acoplado a um espectro de massas GC-MS (Thermo Electron Corporação DSQ II; TLC, Thermo Fisher, Boston, MA, EUA),

Eppendorfs

Espectrofotômetro de placas (Bio Tek – Power Wave XS)

Evaporador rotativo (Modelo R-210 Buich®)

Lamínulas de vidro

Microscópio óptico

Micropipetas (2-20  $\mu\text{L}$ / 50-200  $\mu\text{L}$ / 200-1000  $\mu\text{L}$ )

Pipetas de vidro

Ponteiras

Placas de cultura de células de 24 e 96 poços

Seringas

Tubo Falcon de 15 mL

Turrax (IKA® T10 básico, Wilmington, DE, EUA)

Turbo extrator (Britânia®).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Coleta e identificação

Os frutos de *Pterodon pubescens* Benth. foram fornecidas pela Dra. Jaqueline Hoscheid (coletados na comunidade Mata Cavalo, na cidade de Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brasil Latitude 15°89' S, Longitude 56°41', elevação de 196 metros), no outono, em maio de 2010, no qual as condições meteorológicas para este mês foram de aproximadamente, temperaturas máximas média de 30,4°C, e índice pluviométrico de 0 mm de precipitação e média 87% de umidade máxima relativa do ar (INMET, 2010). A espécie foi identificada pelo Dr. Germano Guarim Neto do Herbário da Universidade Federal do Mato Grosso, e uma exsiccata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá, com o número 20.502.

Todas as extrações e testes biológicos foram realizados utilizando o mesmo lote dos frutos, evitando assim possíveis variantes como a mudança na constituição química dos diferentes materiais.

### 4.2.2 Conservação e estocagem

Após coletados, os frutos de *P. pubescens* foram higienizados e acondicionados em recipientes apropriados evitando-se o contato do excesso de luz, umidade e calor. Proporcionando uma melhor condição de estocagem e armazenamento.

### 4.2.3 Métodos extrativos

#### 4.2.3.1 Extrações para os testes antileishmania preliminares.

Inicialmente foram realizadas extrações pelo método EFS, empregando CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) e C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> (n-propano) conforme figura 7, página 45, e turboextração conforme metodologia descrita por Hoscheid (2013) ilustrado na figura 8a, página. 47. Para as extrações por fluido supercríticos foram obtidos a partir de 39,80 g dos frutos moídos de *P. pubescens*, em 3 extrações consecutivas com o mesmo material vegetal. Resultando nos extratos oleaginosos, EOe1 quando se utilizou como gás extrator o propano líquido comprimido, a temperatura de 40° C, pressão 40 bar e fluxo Ø: 1 ml/min. EOe2 com o extrator propano líquido comprimido, temperatura 80°C, pressão 13 bar e fluxo Ø: 1 mL/min. E por fim, o EOe3 com o CO<sub>2</sub> a temperatura 40°C, com pressão de 100 bar e fluxo Ø: de 2 ml/min.

As extrações pelos métodos convencionais (turboextração) foram realizadas no laboratório de P&D de Fitoterápicos, sala número 12, bloco K80, UEM, enquanto que as extrações supercríticas (EFS) foram realizadas em parceria com o laboratório do prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho do Departamento de Engenharia Química da UEM.

Os extratos e fração foram comparados quanto sua atividade antileishmania nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.

#### 4.2.3.2 Extrações para os testes antileishmania finais.

Escolhidos os melhores extratos dos frutos de *P. pubescens* que apresentaram as melhores atividades antileishmania, procederam-se novas extrações pelos métodos da turboextração e maceração. Os extratos obtidos foram particionados com hexano a fim de se obter a fração hexânica purificada, e para os extratos obtidos a partir da EFS o gás de arraste escolhido foi o CO<sub>2</sub>.

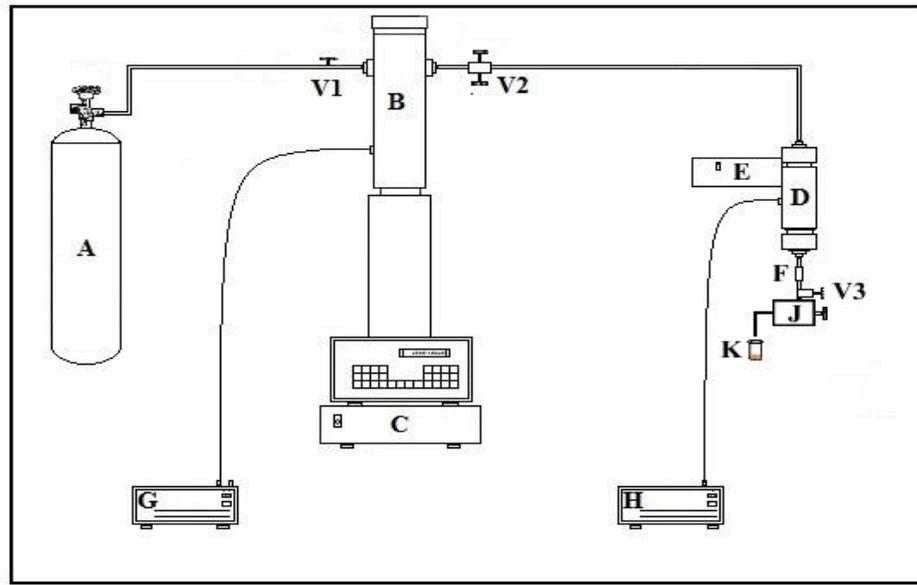
##### 4.2.3.2.1 Extratos por Fluido supercrítico

Visto que o supercrítico por CO<sub>2</sub> foi que apresentou a melhor atividade biológica contra leishmania, então ele foi escolhido para realização de novas extrações na tentativa de otimizar e concentrar os componentes ativos dos frutos de *P. pubescens* com atividade antileishmania. Com o resultado do teste preliminar, aquela extração foi utilizada como ponto central para as novas extrações pelo EFS-CO<sub>2</sub>.

Foi utilizado o solvente CO<sub>2</sub> em escala laboratorial em um aparelho semicontínuo (fig. 7, pag. 45). O módulo experimental construído no laboratório de tecnologia supercrítica da UEM, constituído de um reservatório para o solvente “A”, bomba seringa “B” da marca Teledyne ISCO (modelo 500D) e dois banhos termostáticos “G e H” ambos da marca Quimis (modelo Q214M2). O primeiro com a finalidade de resfriar e comprimir o fluido antes de entrar na bomba seringa, e o segundo para manter o extrator aquecido na temperatura desejada para as extrações.

Trinta gramas dos frutos moídos de *P. pubescens* foram depositados no extrator de aço inox “D” com 2,85 cm de diâmetro por 26 cm de altura e capacidade para 165,86 cm<sup>3</sup>; um forno de aquecimento para saída do óleo extraído com uma válvula micrométrica “J” da marca Autoclave Engineers acoplada, um termorregulador “E” da marca Tholz (modelo CTM-04). O aparelho é formado por uma válvula de expansão “V3”. Os solventes foram resfriados a temperatura próxima aos 5°C para prevenir sua vaporização. Após resfriado na fase líquida, o solvente foi bombeado e introduzido no sistema de extração, entrando na célula de extração, pressurizando o sistema. Uma vez alcançada a pressão de interesse aguardou-se 30 minutos para que os gradientes de temperatura e de pressão fossem quase eliminados. Anotou-se o volume de solvente remanescente na bomba e após isto se iniciou a extração pelo acionamento da bomba “B” e abertura das válvulas “V1 e V2”. A vazão volumétrica utilizada para o CO<sub>2</sub> foi 2 mL/min. As variáveis de pressão e volume do solventes gastos “C” foram monitorados pela bomba seringa. A vazão do volume do solventes foi regulada a partir do ajuste da válvula de expansão, sendo mantida a temperatura de 120°C para CO<sub>2</sub>. Na saída do extrator o óleo dos frutos foi coletado em um recipiente âmbar “K”, previamente pesado em balança analítica de marca

Marte (modelo AM-220). Para obter a cinética de extração, a massa de cada uma delas foi pesada em intervalos iniciais de 5, depois 10 e por fim 20 min. de diferenças (Scodro, *et al.*, 2015; Santos, *et al.*, 2016). Para ambos os fluidos, cessou-se o processo quando a massa pontual, passou a ser constante o que ocorreu em 190 min. As amostras foram armazenadas em freezer abaixo de 0°C, para manter seus constituintes estáveis, e ao abrigo da luz e umidade.



**Figura 7.** Metodologia empregada na extração de extratos oleaginosos de frutos de *P. pubescens* no fluido supercrítico. Notas: A -reservatório (CO<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>); B- bomba de alta pressão; C - controle de bombeamento; D - coluna de extração; E- controlador de temperatura da camisa da válvula micrométrica (termoregulador); F- coluna de adsorção; G e H- banhos termostáticos; V1, V2, V3- válvula globo e agulha; J -camisa de aquecimento e válvula micrométrica; K- frasco coletor. Fonte: Santos, 2016.

Resumidamente, todas as condições das extrações pelo EFS realizadas em todos os testes preliminares e definitivos, estão descritos na tabela 2 com finalidade de melhor compreensão das nomenclaturas das amostras e todas as variáveis utilizadas.

**Tabela 2.** Matriz experimental dos parâmetros utilizados nas extrações por fluido supercrítico.

Amostra	Espécie/Material	Gás	Temperatura	Pressão	Fluxo Ø	min.	Período
EOe1	<i>P. pubescens</i> /Frutos	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	40°C	40 bar	1mL/min	60	1º/2014
EOe2	<i>P. pubescens</i> /Frutos	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	80°C	13 bar	1mL/min	60	1º/2014
EOe3	<i>P. pubescens</i> /Frutos	CO <sub>2</sub>	40°C	100 bar	2mL/min	60	1º/2014
EOe4	<i>P. pubescens</i> /Frutos	CO <sub>2</sub>	20°C	120 bar	2mL/min	190	2º/2014
EOe5	<i>P. pubescens</i> /Frutos	CO <sub>2</sub>	60°C	80 bar	2mL/min	190	2º/2014
EOe6	<i>P. pubescens</i> /Frutos	CO <sub>2</sub>	60°C	120 bar	2mL/min	190	2º/2014
EOe7	<i>P. pubescens</i> /Frutos	CO <sub>2</sub>	40°C	100 bar	2mL/min	190	2º/2014
EOe8	<i>P. pubescens</i> /Frutos	CO <sub>2</sub>	20°C	80 bar	2mL/min	190	2º/2014

#### 4.2.3.2.1.1 Planejamento fatorial para a EFS-CO<sub>2</sub>

O planejamento fatorial utilizado nas extrações finais foi um bifatorial (2<sup>2</sup>) (tabela 3), partindo de um ponto central, que foi definido a partir dos resultados dos testes preliminares. No planejamento ocorreram variações em dois pontos para mais ou para menos nas extrações, variando as temperaturas e as pressões, níveis estes que foram denominados alto e baixo e representados por (+1) e (-1) e o ponto central (0).

**Tabela 3.** Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central conseguido pelos testes preliminares.

T	P	T (°C)	P (bar)
+1	-1	60	80
-1	+1	20	120
0	0	40	100
-1	-1	20	80
+1	+1	60	120

Notas: T: Temperatura; P: Pressão.

Esse planejamento fatorial foi atribuído com o objetivo de avaliar dois níveis de variáveis sobre a eficiência do processo extrativo em massa de extrato final, dos frutos de *P. pubescens* aplicados ao método de EFS-CO<sub>2</sub> (teste definitivos).

#### 4.2.3.2.2 Extração por turboextração

Trinta gramas dos frutos de *P. pubescens* foram submetidos a três extrações consecutivas em etanol, pelo método de turboextração. Em cada extração foram utilizados 200 mL de etanol 99.95%, totalizando 600 mL de solvente. A cada quinze minutos de turboextração realizou-se a filtração do extrato com auxílio de membrana de nylon e o solvente renovado. Posteriormente realizou-se a concentração do extrato em evaporador rotativo a vácuo (figura 8). O extrato foi acondicionado em recipiente fechado e armazenado a -20°C até seu fracionamento. A temperatura de extração e de retirada do solvente não ultrapassou a 40°C, evitando a perda e degradação de compostos voláteis.

#### 4.2.3.2.3 Extração por maceração.

O procedimento de extração por maceração foi realizado sob agitação mecânica constante de oito horas empregando 30 g dos frutos de *P. pubescens*, cortados com o auxílio de uma tesoura de poda, em quatro partes (evitando o calor gerado, no atrito do moinho de facas) e 200 mL de etanol 99,8%, como solvente extrator, renovados a cada três dias com o mesmo volume de etanol. Os extratos foram filtrados com auxílio de papel filtro e funil, totalizando 600 mL. Em seguida concentrou-se o extrato bruto *P. pubescens* sob pressão reduzida (fig. 8c), acondicionando-o no freezer em frasco âmbar, limpo e hermeticamente fechado.

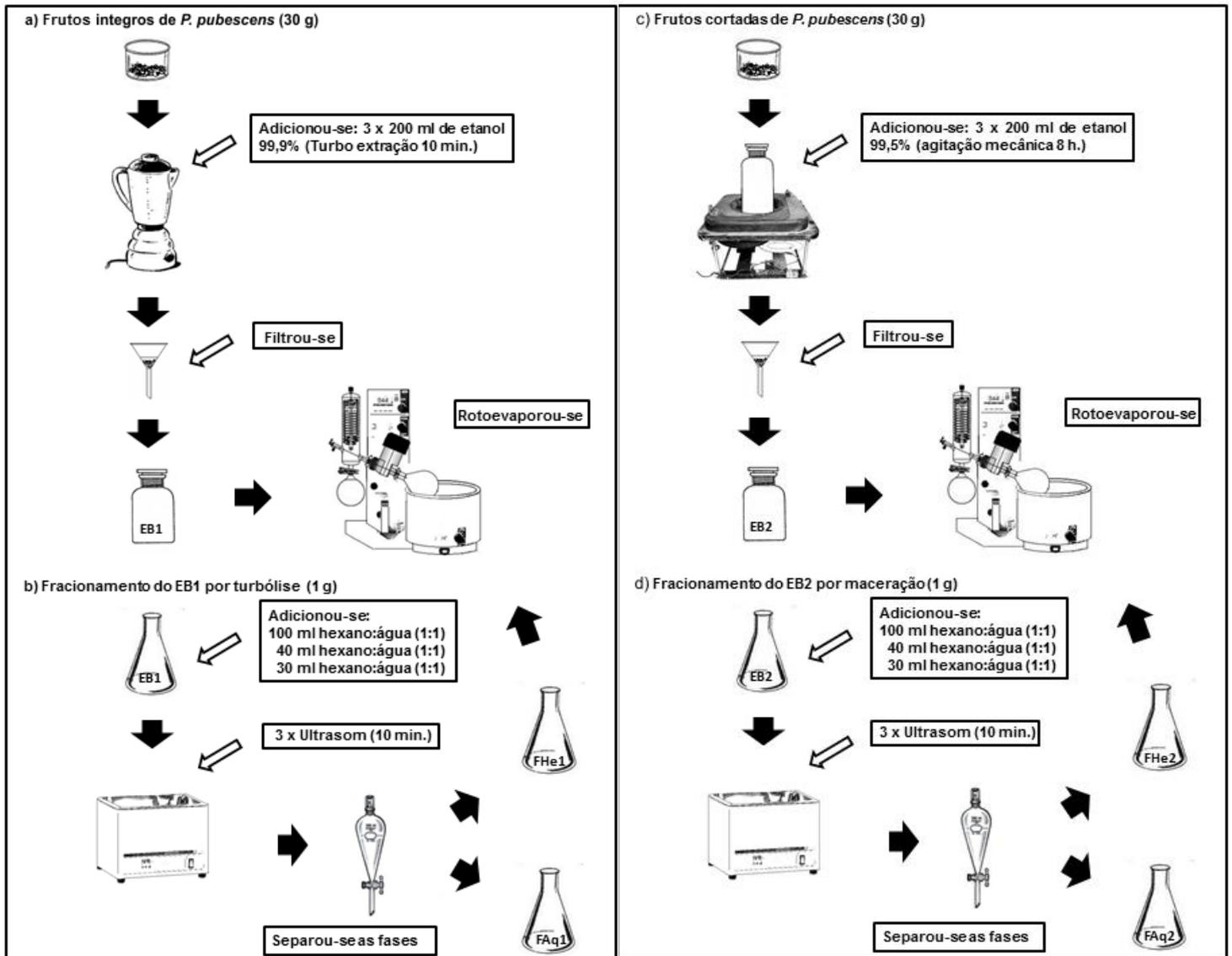


Figura 8. a) Extração por turboextração; c) extração por maceração; b e d) Fracionamento dos extratos brutos de *P. pubescens* (EB's). Fonte: Santos, 2016.

#### 4.2.3.2.3.1 Fracionamento dos extratos brutos etanólicos de *P. pubescens*

Para o fracionamento dos extratos brutos de *P. pubescens* obtidos por turboextração (figura 8.b) e maceração (figura 8.d), inicialmente adicionou-se ao extrato, 100 mL; 40 mL e por fim 30 mL de hexano:água (1:1), colocando estas três preparações em banho de ultrassom (10 min.), para que as fases fossem separadas (fração aquosa:fração hexânica). Com auxílio de um funil de separação e papel filtro realizou-se a coleta das duas frações hexânicas por turboextração (FHe1) e maceração (FHe2), e os remanescentes aquosos (FAq1 e FAq2).

#### 4.2.4 Preparação das nanoemulsões NE.

As NE foram preparadas em parceria entre o Laboratório de P&D de Fitoterápicos, sala número 12 (K80) UEM, e o Laboratório de Pesquisa e desenvolvimento de Sistema de Liberação de Fármacos (K80) UEM, do Prof. Dr Marcos Luciano Bruschi.

Ambas as formulações foram preparadas utilizando a mesma metodologia. As NE foram desenvolvidas utilizando a fração FHe1 e o extrato EOe4 de *P. pubescens*, como agente tensoativo não iônico utilizou-se o PEG-40H óleo de rícino, Phospholipon® 90G, e a água destilada. As concentrações utilizadas foram (5,0%, p/p) de extratos FHe1 e EOe4 ou seja 0,5 g, Phospholipon 90G (5,0%, p/p), também 0,5 g. PEG 7,5% (0,75 g) e 82,5% de água (8.25g). Após a pesagem, primeiramente agitou-se com auxílio de um agitador magnético para que ocorresse a dissolução total das amostras juntamente com o Phospholipon 90H, e em outro recipiente a água com o PEG 40 H.

Em seguida adicionou-se as amostras (FHe1 e EOe4) misturadas com Phospholipon, sobre a água e agente tensoativo, por cisalhamento de alta velocidade, utilizando o aparelho turrax (IKA® T10 básico, Wilmington, DE, EUA) a 14.500 rpm durante 15 minutos. Após as NE foram deixados em repouso durante 24 h, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , para assegurar o equilíbrio das amostras (Hoscheid *et al.*, 2015).

No final das formulações, elas apresentavam-se transparentes e sem quaisquer partículas em suspensão. As amostras foram colocadas em recipientes hermeticamente fechados, limpos e armazenadas em um ambiente com temperatura devidamente controlada ao abrigo da luz e da umidade. Elas foram nomeadas: N.FHe1 - NE da fração hexânica dos frutos de *P. pubescens* por turboextração; e N.EOe4 – NE com o extrato supercrítico (20 T 120 P) dos frutos de *P. pubescens*.

#### 4.2.5 Caracterização físico-química das NE

##### 4.2.5.1 Tamanho de gotícula

A distribuição de tamanho e o tamanho das gotículas (índice de polidispersão, PDI) foram mensurados utilizando um analisador de partículas (Beckman Coulter DELSA™Nano C, Califórnia), por técnica de espalhamento de luz estático (DLS). O analisador de partículas utilizado apresentava limite de detecção aproximado de 0,6 nm a 7,0  $\mu\text{m}$ . Gotículas de tamanho nanométrico estão continuamente em movimento Browniano, resultando em uma variação da intensidade de luz dispersa, esta flutuação de luz é medida pela técnica de SLS (Ghosh *et al.*, 2013). Assim, as formulações foram diluídas na razão 1:10, em água ultrapura, segundos antes da determinação, para minimizar os efeitos da dispersão. O tamanho das gotículas foi expresso em nm.

#### 4.2.6 Análises em Cromatografia Gasosa acoplada ao espectro de massas CG/MS

Constituintes do óleo de *P. pubescens* foram avaliados por CG-EM (Thermo Electron Corporation DSQ II; TLC, Thermo Fisher, Boston, MA, EUA), usando um sistema equipado com uma coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm), e programa de temperatura: 180°C (4°C min<sup>-1</sup>) –270°C (3 min); injetor: 270°C; detector: 270°C. Gás Hélio foi utilizado com arraste (0,7 bar; 1 mL/min). Espectros de massas foram obtidos a 70 eV. A velocidade de leitura foi de 0,5 scans/s, na faixa de razão massa/carga (*m/z*) de 50 a 650. O volume das amostras foi de 1 µL, com razão de split de 1:20. As amostras foram diluídas em clorofórmio.

Análises de revalidação de metodologia foram conduzidas com CG-EM com monitoramento de íons selecionados (CG-EM-MIS), onde os íons monitorados foram 105, 109 e 175 (entre 23,3 e 24,0 min), 131, 178 e 312 (de 24,0 a 25,8 min), e 105, 202 e 326 (entre 25,8 e 26,5 min). Validação analítica segundo metodologia descrita por Hoscheid *et al.* (2015).

#### 4.2.7 Ensaios de suscetibilidade

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Bloco B-08 sob a responsabilidade do Prof. Dr Celso Vataru Nakamura.

##### 4.2.7.1 Ensaio antiproliferativo com promastigotas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas a 25°C em meio de Warren (Infusão de Cérebro e Coração “Difco<sup>®</sup>” + hemina + ácido fólico) com pH 7 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco) e incubadas a 25°C em estufa microbiológica

Pesou-se 10 mg dos extratos testes e solubilizou-os em DMSO de modo que suas concentrações finais correspondesse a 10.000 µg/mL (amostras com 100 µL de DMSO, mais 900 µL meio de cultura). Para a diluição dos compostos utilizou-se a fórmula a seguir:

**Equação 1.** Equação utilizada para a diluição dos compostos.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Como os compostos foram diluídos após o acréscimo das promastigotas, o cálculo foi efetuado considerando 10 vezes da concentração a ser testada, que foram adicionadas nos tubos (ependorfs) estéreis com auxílio de micropipetas. As concentrações finais dos compostos testados foram: 1000, 500, 100, 50, 10 e 1 µg/mL. Também foi realizado um controle negativo, com a ausência dos compostos testes.

Dispensou-se 100 µL/poço de cada diluição em duplicatas nas placas de 24 poços. Após agitou-se com um auxílio de uma pipeta de vidro a cultura das promastigotas, e preparou-se uma diluição de 50 vezes em formalina (980 µL de formalina e 20 µL de promastigotas). Realizou-se uma contagem das promastigotas no quadrante central da câmara de Neubauer, em um microscópio de óptico e em seguida aos resultados obtidos dos protozoários aplicou-se a seguinte equação:

**Equação 2.** Equação para a padronização do inóculo de promastigotas (Pip).

$$Pip = \left(\frac{\bar{x}}{2}\right) \times 50 \text{ diluição} \times 10^4 \text{ fator da câmara de neubauer}$$

Após a padronização do inóculo, calculou-se o volume de cultura dos protozoários necessário para preparar 12,6 mL de suspensão a  $1 \times 10^6$  promastigotas/mL, utilizando a equação 1. Preparou-se o “pool” das formas promastigotas em um tubo Falcon utilizando o volume das células protozoárias anteriormente calculados. Obteve-se a volume final de 12.600 µL, com a somatória dos protozoários (promastigotas), soro fetal bovino (10% do volume total do “pool”) e meio Warren e diluições dos compostos. Por fim, adicionou-se antibiótico, para evitar a contaminação por outros microrganismos, visto que as amostras foram obtidas de extratos naturais e essas são mais propícias a contaminação.

Adicionou-se 100 µL das diluições dos compostos, e o controle negativo, apenas meio de cultura. Após, as placas foram devidamente fechadas, identificadas e incubadas em estufa bacteriológica por 72 h a 25°C. Para a leitura, diluiu-se o conteúdo do poço em formalina 3%, agitou-se em vortex as amostras, e contou-se os protozoários com auxílio de câmara de Neubauer em microscópio óptico. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle. O  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50% dos parasitos) foi determinado por análise de regressão logarítmica dos dados. Experimentos foram realizados com no mínimo três experimentos independentes.

#### 4.2.7.2 Atividade leishmanicida em amastigotas intracelulares

Experimentalmente pesou-se 1 mg das amostras testes (FHe1 e EOe4), e preparou-se duas soluções estoques de 1000 e 100 µg/mL, no qual adicionou-se 100 µL de DMSO, e mais 900 µL de meio de cultura. Dessas duas preparações foram realizadas as diluições, obtendo as concentrações finais dos extratos testes em 50, 25, 10 e 1 µg/mL de extratos e frações. Para as NE não foi adicionado DMSO para não alterar as formulações. Como elas apresentavam teoricamente uma determinada quantidade de extrato, baseou-se para fazer os cálculos com os dados de massa e porcentagem de óleo de cada NE. Para a N.FHe1 (em 1 mg de NE apresenta teoricamente 0,05 mg de óleo), foram tomados, com auxílio de micropipeta, 11,4 µL da NE e adicionados 10 vezes de meio RPMI, ou seja 988,6 µL, tendo nesta solução 500 µg de óleo em 1000 µL de solução. A partir desses valores foram empregadas

as quantidades pré-determinadas destas soluções, contendo as concentrações respectivamente requeridas. O mesmo procedimento foi utilizado para a nanoemulsão N.EOe4.

Para o ensaio em amastigotas macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos BALB/c, de 3 a 8 semanas de vida. Seringas foram preenchidas de forma asséptica com PBS 0,01 M gelado, que foi injetado na cavidade peritoneal dos animais previamente eutanasiados com lidocaína (10 mg/kg) e tiopental (200 mg/kg) via intraperitoneal. Posteriormente, com a mesma seringa, o conteúdo foi retirado da cavidade e mantido a 4°C. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada durante 10 min, a 1500 rpm e a 4°C, promovendo a formação de um sedimento de células, o qual foi ressuspenso em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, para formar uma suspensão de concentração  $5 \times 10^5$  macrófagos/mL. Essas células foram adicionadas sobre lamínulas de vidro contidas em placas de 24 poços. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2 h, a fim de promover a aderência dos macrófagos às lamínulas. Em seguida, as células que não aderiram foram retiradas por enxague do poço com meio de cultura. Os macrófagos foram, em seguida, colocados em contato com promastigotas de *L. amazonensis*, com 5 a 6 dias de repique, e incubados por 4 h, a 34°C e tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os extratos e NE (FHe1, EOe4, N.EOe4 e N.FHe1), controle negativo e controle positivo (Miltefosina), foram diluídos em RPMI suplementado com 10% de SFB, e adicionados sozinhos e combinados, após lavagem dos poços para retirada dos protozoários não internalizados. As placas foram, então, incubadas por 48 h, a 34°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim desse período, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas foram fixadas com metanol, durante 10 min e coradas com Giemsa 10% em PBS 0,01 M, durante 40 min. As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico por contagem do número de macrófagos totais e infectados e o número de amastigotas dentro dessas células hospedeiras.

A visualização de pelo menos 100 células foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de um contador de células. Foi calculado o número total de amastigotas em cada experimento pelo número de macrófagos, a porcentagem de macrófagos infectados, o índice de seletividade das amastigotas intracelulares sobre os macrófagos, a porcentagem de sobrevivência dos protozoários e por fim a porcentagem de sobrevivência. Com todos os resultados obtidos foi calculada a concentração inibitória de 50% dos protozoários CI<sub>50</sub> e CI<sub>90</sub> em µg/mL das drogas testadas. O índice de sobrevivência foi estabelecido multiplicando-se o percentual de células infectadas pelo número médio de parasitos por célula. Primeiro, calculou-se o índice de sobrevivência do controle negativo e para os tratados, após com uma regra de três encontrou-se a porcentagem de sobrevivência e por fim calculou-se a porcentagem de inibição das drogas testadas nas diversas concentrações comparando-se com os controles.

**Equação 3.** Equações para os cálculos das porcentagens de inibições nas formas amastigotas intracelulares (interação com macrófagos peritoneais).

$$IS = \frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas totais}}{n^{\circ} \text{ de m}\emptyset \text{ totais}} \times \% \text{ de m}\emptyset \text{ infectado}$$

$$PS\% = \left( \frac{ISO \text{ do controle} - - - 100}{ISO \text{ dos tratados} - - - x} \right)$$

$$PI\% = 100\% - PS\%$$

Foram construídas curvas de PI versus logaritmo da concentração testada. O resultado foi expresso em  $CI_{50} \pm$  desvio padrão de, pelo menos, três experimentos realizados independentemente.

#### 4.2.8 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de MTT (Mossmann, 1983), foi feito em macrófagos murinos da linhagem J774A1 a fim de se determinar a citotoxicidade dos diferentes extratos. Macrófagos J774A1 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA), respectivamente, pH 7.6, suplementado com 10% de SFB, incubados em estufa microbiológica a 37°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Pesou-se um 1 mg das amostras testes para as frações e extrato FHe1, FHe2 e EOe4 solubilizando-as em DMSO. Para as nanoemulsões N.FHe1 e N.EOe4 diluiu-se diretamente no meio de cultura. Esses procedimentos foram realizados de modo que as concentrações finais dos extratos e NE correspondessem a concentrações finais de 1000 µg/mL.

O efeito citotóxico das substâncias foi determinado a partir de cultura de macrófagos, com um inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  céls/mL em RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB e solução de penicilina 50 µg/mL de gentamicina. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços estéreis, com incubação a 37°C com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h com a finalidade de formação das monocamadas celulares. Após este período, foram adicionadas sobre as monocamadas, as substâncias (FHe1, FHe2, EOe4, N.FHe1 e N.EOe4) em diferentes concentrações testadas 1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL. O controle negativo de células (sem adição da substância) também foi realizado. As microplacas foram incubadas por 48 h, logo após a adição das substâncias. Transcorrido o período de incubação, o meio dos poços foi removido, e os poços foram lavados com tampão fosfato (PBS), e após este procedimento foram adicionados a eles 50 µL de MTT (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-yl]-2, 5-difeniltetrazolium bromido formazan (1 mg/mL) que é um sal de coloração amarelada e na presença de células metabolicamente ativas, capaz de captar elétrons em uma reação de oxi-redução, formando um precipitado insolúvel de coloração roxa, o formazan. As placas foram incubados por 4 h a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, protegido da luz com papel craft. Por fim adicionou-se 150 µL de dimetilssulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço nas microplacas foi lida no comprimento de onda de 570 nm

em um espectrofotômetro de placas (Bio Tek – Power Wave XS) e através dessas absorvâncias desses produtos é medida a viabilidade metabólica celular.

A  $CC_{50}$  (concentração citotóxica dos compostos testes a 50% das células) foi obtida por análise de regressão de curva dose-resposta, % de citotoxicidade celular =  $100 - (DO_{tto} / DO_{cc})$ , onde:  $DO_{tto}$  = densidade óptica do tratado e  $DO_{cc}$  = densidade óptica do controle de células. Os valores de  $CC_{50}$  apresentados com média  $\pm$ , desvio padrão, experimentos realizados com no mínimo três experimentos independentes. Índice de Seletividade (IS) *in vitro* foi calculado pela razão  $CC_{50}$  macrófagos/ $CI_{50}$  amastigotas.

#### **4.2.9 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão e análise dos dados foi realizada utilizando o programa Excel (Microsoft Corporation). A análise fatorial utilizou-se Software R® versão 3.3.0 (The Foundation R, Vienna, AUT). Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ANÁLISES PRELIMINARES

#### 5.1.1 Teste para comprovar a atividade dos extratos de *P. pubescens* em *L. amazonensis*

Como é sabido, produtos de origem natural têm desempenhado um importante papel no processo de desenvolvimento de novas drogas bioativas (Calixto, 2000). E os vegetais têm fornecido compostos promissores frente a doenças como as leishmanioses em todo o planeta (Anthony *et al.*, 2005). Atualmente já foram isolados compostos de plantas medicinais utilizadas no tratamento de leishmanioses, que provavelmente tenham ação inibitória contra uma ou mais enzimas específicas dos parasitos (Shukla *et al.*, 2010).

Os resultados do teste preliminar evidenciaram um bom potencial de inibição em formas promastigotas de *L. amazonensis* frente aos extratos oleaginosos dos frutos de *P. pubescens*, apresentando em ordem decrescente os melhores resultados em valores das  $CI_{50}$  de 19,50  $\mu\text{g/mL}$  para o EOe3 (EFS- $\text{CO}_2$ ), seguido pelo EOe1, EOe2 (EFS- $\text{C}_3\text{H}_8$ ) e a FHe1 respectivamente 30,7; 52,5 e 60  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 4). Estes resultados mostram que a extração por fluido supercrítico melhorou biologicamente a atividade dos extratos, já que o EOe3 foi mais ativo. Por fim ocorreu uma variação nos resultados quando avaliou-se os diferentes gases de arraste no EFS, no qual o dióxido de carbono foi superior quando comparado ao propano líquido. Todos os extratos apresentaram efeito concentração-dependente.

**Tabela 4.**  $CI_{50}$  dos extratos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* nos testes preliminares.

Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV
FHe1	$60,0 \pm 14,4$	0,23
EOe1	$30,7 \pm 6$	0,19
EOe2	$52,5 \pm 3,5$	0,06
EOe3	$19,5 \pm 4,2$	0,21

Notas: FHe1: fração hexânica por turboextração; EOe1: extrato oleaginoso-supercrítico propano (40°C/40 bar); EOe2: extrato supercrítico-n propano (80°C/13 bar); EOe3: extrato supercrítico  $-\text{CO}_2$  (40°C/100 bar);  $CI_{50}$ : concentração inibitória de 50% dos protozoários;  $\pm$ : desvio Padrão; CV: coeficiente de variação.

Correlacionando estes resultados da atividade biológica nos testes preliminares é uma justificativa de porque o EFS- $\text{CO}_2$  apresentou os melhores resultados, por apresentar a maior concentração em área dos componentes diterpenos nos extratos. Resultados mostrados na tabela 5, evidenciaram que as EFS são superiores a FHe1, no qual o EOe3 extraiu maior concentração de compostos, seguidos do EOe2 e EOe1. Acredita-se que o  $\text{CO}_2$  apresentou maior seletividade na extração dos constituintes presentes nos extratos dos frutos de *P. pubescens*.

**Tabela 5.** Somatória da áreas dos picos dos cromatogramas dos extratos utilizados no teste preliminar, obtidos por CG-EM.

Amostra	Somatória das áreas
FHe1	1110916975
EOe1	2164239387
EOe2	2556296351
EOe3	2879502324

Notas: FHe1: fração hexânica por turboextração; EOe1: extrato supercrítico-n propano (40°C/40 bar); EOe2: extrato supercrítico-n propano (80°C/13 bar) ; EOe3: extrato supercrítico-CO<sub>2</sub> (40°C/100 bar).

Além de apresentar a melhor atividade, a amostra quando extraída com o CO<sub>2</sub> mostrou-se o melhor rendimento quantitativo de extrato em massa de *P. pubescens* (tabela 6) quando comparada com o n-propano e suas respectivas variações de temperatura e pressão.

Segundo Wu et al. (2012) a extração com EFS-CO<sub>2</sub> aumentou a extração de compostos polares, comparada com uma extração convencional com solvente orgânico. De acordo com Mesomo, (2013), quanto a utilização do EFS-CO<sub>2</sub> na extração de gengibre, a pressão também se mostrou com efeito positivo significativo na extração, e estes apresentaram maior atividade antioxidante e antibacteriana comparadas com EFS-n propano. Resultados parcialmente convergentes aos encontrados por Lemos *et al.* (2011), no qual mostrou em seu trabalho que a diminuição de pressão em extração supercrítica com folhas de *Piper regnelli*, conseqüentemente, diminuiu a densidade do fluido, refletindo na diminuição da atividade frente a bactérias gram positivas. Carrara *et al.* (2011), no qual EFS das folhas de *Piper amalago* foram comparados, o EFS-CO<sub>2</sub> apresentou melhor conteúdo de alcaloides, conseqüentemente melhor atividade antileishmania em promastigotas de *L. amazonensis*, sem apresentar citotoxicidade, em relação ao EFS n-propano.

**Tabela 6.** Rendimento em massa extrativa por EFS referente ao teste preliminar.

Amostra	Massa (g)
EOe1	0,989
EOe2	0,796
EOe3	1,502

Notas: EOe1: Extrato supercrítico-n propano (40°C/40 bar); EOe2: Extrato supercrítico-n propano (80°C/13 bar); EOe3: Extrato supercrítico CO<sub>2</sub> (40°C/100 bar)

A chamada “química e tecnologia verde” pode ser definida como desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos no qual tem o objetivo de reduzir e eliminar a utilização e não geração de substâncias nocivas à saúde humana e ambiental (Anastas e Warner, 1998; Zhang e Cue, 2012). Atualmente há uma crescente valorização da “química verde” que é necessária na concepção e realização do desenvolvimento sustentável, alcançando objetivos econômicos e ambientais simultâneos (Tundo *et al.*, 2000). Metodologia que agride menos o meio ambiente e vem revolucionando metodologias antigas de extrações, como é o EFS apesar de não estar completamente difundido, tem todos os requisitos para reverter varias situações críticas atuais da pesquisa relacionada com a conservação, preservação e sustentabilidade do meio ambiente.

## 5.2 ANÁLISES DEFINITIVAS

### 5.2.1 Otimização de um melhor extrato com as diferentes metodologias de extração

Os resultados dos rendimentos dos extratos e das frações obtidos pelos métodos convencionais (turboextração e maceração) estão apresentados na tabela 7, e os resultados dos rendimentos das extrações supercríticos para os testes finais são apresentados na figura 9 (cinética). Entre os convencionais turboextração e maceração, o rendimento foi superior apenas no extrato bruto por turboextração, o que era esperado, pois há uma maior diminuição do tamanho das partículas e maior contato com o solvente extrator, obtendo assim um maior rendimento em massa. Quando particionadas as frações hexânicas e aquosas obtiveram-se a mesma porcentagem de rendimento, por ambos os métodos convencionais.

**Tabela 7.** Rendimento extrativo dos extratos referentes aos métodos de turboextração e maceração.

Método extrativo	Frutos em g	EB's g/%	FHe's g/%	FAq's g/%
Turboextração	30	9,5/31,66%	5,7/60%	3,8/40%
Maceração	30	7,2/24%	4,3/60%	2,9/40%

Notas: EB's: extratos brutos; FHe's: frações hexânicas; FAq's: frações aquosas.

Quando avaliamos e comparamos a efetividade na extração dos constituintes dos frutos de *P. pubescens*, tentando validar uma melhor metodologia, avaliando as suas atividades antileishmania. Todos os extratos testados apresentaram resultados considerados promissores e positivos contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Entre as frações hexânicas, a (FHe1) foi a melhor, com média de  $CI_{50}$  41  $\mu\text{g/mL}$  contra 52,2  $\mu\text{g/mL}$  da macerada (FHe2). Para as frações aquosas, a (FAq2) foi superior a (FAq1) com a  $CI_{50}$  de 26,7 e 36, respectivamente (tab. 8). As  $CI_{90}$ , exibiram o padrão muito semelhante aos encontrados anteriormente, no qual as FAq's apresentaram as melhores  $CI_{90}$  seguido das (FHe's), exibindo uma relação da razão entre o  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  um aumento da concentração cerca de três vezes passando de inibir 50% para 90% de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Considerando que na turboextração ocorre ruptura mecânica das células vegetais, liberando os princípios ativos que rapidamente são dissolvidos pelo líquido extrator até saturação do mesmo, é possível justificar os resultados acima expostos. Já na maceração não ocorreu o esgotamento total dos constituintes, tendo menor relação de contato entre os solventes e os fragmentos dos frutos, sendo menos eficiente, relação explicada pela não total ruptura das células, dificultando a extração já que o princípio físico seria a troca difusional entre as células e o solvente. Podemos caracterizar a turboextração como a mais eficiente entre as técnicas convencionais, uma vez que precisou apenas 10 minutos em tempo de extração comparada com 480 min na maceração, apresentando um melhor efeito antiproliferativo. Estes resultados em parte são apresentados por List e Schmidt (1990), no qual evidencia que a turboextração é muito mais vantajosa comparada a outras técnicas convencionais por

além de apresentarem extrações em termos de minutos, apresentam extratos mais ricos, comparados com técnicas que levam vários dias, como a maceração sem agitação constante (10 dias).

Por fim, os EFS apresentaram os melhores resultados, confirmando junto com os resultados anteriores que o EFS-CO<sub>2</sub> foi superior aos obtidos pelas metodologias convencionais. No contexto geral todos os EFS-CO<sub>2</sub> apresentaram excelentes efeitos antiproliferativos. Os resultados mostram que o EOe6 foi o que apresentou uma leve superioridade frente às promastigotas com a média de CI<sub>50</sub> 25,9 µg/mL de CI<sub>50</sub>, em comparação os extratos EOe4, EOe5 e EOe8 no qual não diferiram apresentando a mesma atividade com médias CI<sub>50</sub> de 26,3 a 26,4 µg/mL, resultados mostrados na tabela 8. Esta leve superioridade pode ser atribuída a maior presença dos dois picos majoritários do geranilgeraniol e o epóxi geranilgeraniol (fig. 13), comparados pelas suas relativas abundâncias. O extrato menos ativos dos EFS-CO<sub>2</sub> foi o EOe7 com média de CI<sub>50</sub> 28,4 µg/mL, respectivamente o que apresentou a menor abundância relativa dos compostos citados anteriormente. Os resultados do CI<sub>90</sub> (tab. 8) apresentaram o mesmo padrão encontrado nos resultados do CI<sub>50</sub> com uma leve melhora da atividade com o EOe5 e após, todos os outros em seguida tiveram poucas variações de 80 a 82 µg/mL de CI<sub>90</sub>. A relação razão, entre inibir 50% para inibir 90% dos parasitos foi um aumento de cerca de três vezes a concentração das drogas, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

**Tabela 8.** Efeito antiproliferativo em promastigotas na comparação entre metodologias de extrações dos frutos de *P. pubescens*. CI<sub>50</sub> e CI<sub>90</sub>

Amostras	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	CV	CI <sub>90</sub> (µg/mL)	CV
FHe1	41,0 ± 18,4	0,44	88,5 ± 0,7	0,01
FAq1	36,0 ± 08,5	0,23	82 ± 8,4	0,10
FHe2	52,1 ± 11,1	0,21	97 ± 2,8	0,03
FAq2	26,7 ± 0,3	0,01	82,3 ± 1,5	0,02
EOe4	26,3 ± 3,1	0,10	80,6 ± 0,8	0,01
EOe5	26,3 ± 1,5	0,07	80,0 ± 1,4	0,02
EOe6	25,9 ± 1,6	0,06	79,5 ± 2,1	0,03
EOe7	28,4 ± 1,9	0,07	82,0 ± 1,4	0,02
EOe8	26,4 ± 2,2	0,09	80,5 ± 0,7	0,01

Notas: FHe1 e FAq 1: Frações hexânica e aquosa por turboextração; FHe2 e FAq2: Frações hexânica e aquosa por maceração; EOe's: EFS-CO<sub>2</sub>; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50% dos protozoários. CI<sub>90</sub>: concentração inibitória de 90% dos protozoários. ±: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variação.

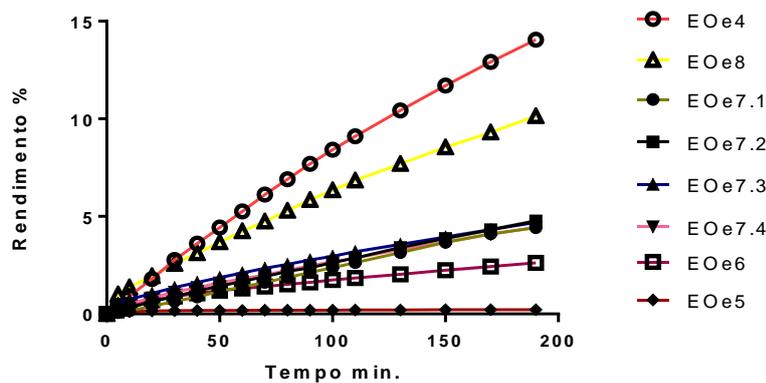
Resultados a favor, relatados por Hayacibara *et al.* (2005), no qual afirmaram que o método empregado na extração influencia diretamente no rendimento e na atividade farmacológica dos extratos, que também pode ser influenciada pela partição líquido-líquido. A escolha do solvente é crucial para alcançar a atividade terapêutica desejada, de acordo com Couto *et al.* (2010).

Em termos de rendimento em massa de extrato por ambos os métodos de turboextração e maceração mostrou-se superiores a EFS. Mas o fato de que extrações supercríticas são consideradas a favor da natureza, e a tendência é de se tornar uma opção viável e obrigatória daqui a algumas décadas dentro de laboratórios de pesquisas e industriais. Segundo Maul (1999), um dos problemas na extração com solventes orgânicos é a dificuldade da retirada dos mesmos nos extratos. Já no EFS, uma etapa

não presente, elevando o grau de pureza das amostras (Rizvi *et al.*, 1986). Além de ser uma técnica flexível, possibilitando variações nos parâmetros de extrações, diferindo na composição dos mesmos em relação a técnicas convencionais, podendo maximizar concentrações de compostos majoritários (Filippis, 2001). Entre as variantes maleáveis se tem: a escolha do solvente apropriado para cada material, tamanho da partícula, temperatura, tempo de extração, pressão e fluxo do solvente (Caude e Thiébaud, 1999; Dos Santos Garcia *et al.*, 2012). Entre as variáveis utilizadas no nosso estudo foram a escolha de um melhor solvente extrator com melhor atividade e o fluxo no teste preliminar; temperatura e pressão nos testes finais.

A utilização de fluido supercrítico atende alguns dos requisitos ideais de extrações, que os métodos convencionais não cumprem, por exemplo, os convencionas requerem várias horas para alcançar recuperação satisfatória de analítico, e até mesmo as vezes deixam de fazer, já o supercrítico ocorre a constante recuperação e reciclagem dos gases. A degradação, bem como a poluição atmosférica pode acompanhar estas etapas nos métodos convencionais (Sapkale *et al.*, 2010).

Os resultados mostram que ocorreram diferenças entre os diferentes métodos, apresentando melhor atividade quando se extraiu em EFS em comparação com os métodos convencionais. Porém não ocorreram diferenças significativas quando variou-se condições nas EFS com atividade antiproliferativa. Então escolhemos o melhor extrato pelo rendimento em massa extrativa, sendo um ponto chave e importante na escolha e na utilização de um fitoterápico. A figura 9 apresenta a cinética do rendimento em porcentagem nas EFS-CO<sub>2</sub> (testes finais).



**Figura 9.** Cinética do rendimento na extração por fluido supercrítico dos frutos de *P. pubescens*. Notas: T: Temperatura (graus Célsius); P: Pressão (bar); Tempo 200 minutos de extração.

O EOe4 apresentou o melhor rendimento com cerca de 14% em massa de extrato em 200 minutos de extração supercrítica-CO<sub>2</sub>, partindo de 30g de frutos sendo superior a todos os outros, seguido do EOe8 com 10%, 4,5% com o EOe7; 2,6% o EOe6 e 0,2% para o EOe5. Para Michielin (2002), com o aumento da pressão no EFS, o óleo de fácil acesso presente na superfície das partículas é rapidamente extraído, devido ao aumento do poder de solvatação do CO<sub>2</sub>. Escolheu-se o EOe4 para os próximos ensaios microbiológicos. Uma alternativa quando não há diferenças significativas nos

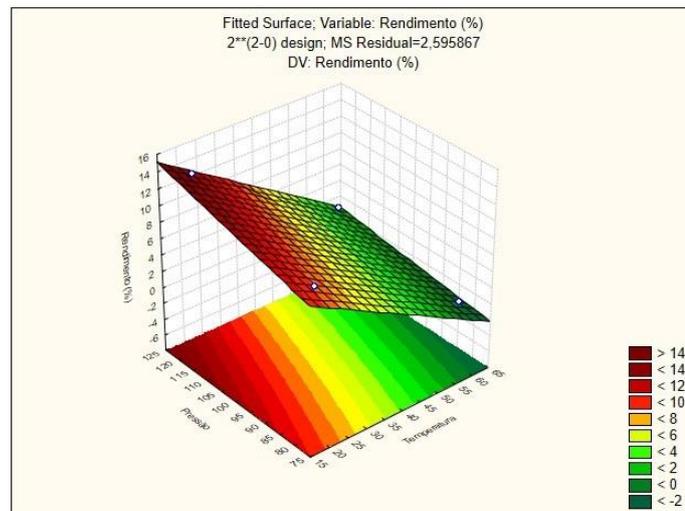
resultados na otimização de um produto ou processo é a avaliação do “custo-benefício” até a finalização do produto de interesse, uma vez que a indústria preza a economia de seu processo. Se o custo for elevado, todo o trabalho corre o risco de ser inviável, mesmo apresentando uma boa atividade. No EFS a quantidade de CO<sub>2</sub> gasto é ínfimo não sendo um parâmetro justificável, e a quantidade de extrato final é mais destacada e importante em si.

O aumento da pressão sob temperatura baixa, aumenta a densidade do fluido aproximando-se de características de um líquido, aumentando assim seu poder de solvatação (Penedo, 2007), que dependendo do material vegetal o rendimento é governado por esse poder, indiferente da afinidade química entre o material e o extrator (Costa, 2013). Segundo Papamichail *et al.* (2000), o aumento da pressão, eleva a densidade do CO<sub>2</sub> e conseqüentemente a sua capacidade de dissolução nas amostras. Outra variável na extração é atribuída ao tamanho das partículas, quanto menores, maior a taxa de extração. O tempo de contato entre o fluxo do supercrítico e o material também interfere no rendimento, uma vez que a penetração e a solubilidade do solvente extrator será influenciada (Bulley *et al.*, 1984), como também a porosidade da matriz sólida de extração e afinidade química dos solutos ao solvente (Costa, 2013). Um dos fatores mais importantes que afeta a composição e o rendimento de EFS é a seleção ideal da pressão e temperatura, com a solubilidade dos diferentes componentes (Díaz-Maroto *et al.*, 2002). Converte ao resultado encontrado em nosso trabalho, que com aumento da pressão obteve-se um maior rendimento em massa extrativa.

O uso de CO<sub>2</sub> evita a contaminação por solventes potencialmente perigosos e permite a extração rápida em função da alta mobilidade das moléculas nos fluidos (Atkins e Jones, 2011). O CO<sub>2</sub> é o gás mais utilizado em extração supercrítica por ser mais barato, perdendo apenas para a água (Maul, 1999; Harris, 2009), ter alta pureza, ter grande poder seletivo, ser inerte não acarretando reações secundárias de oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas (Hawthorne, 1990; Michielin, 2002), e por ser removido facilmente do material extraído. Segundo Santos *et al.* (2000) as EFS-CO<sub>2</sub> vem sendo estudadas na substituição do hexano em indústrias, que é um solvente tóxico e inflamável, causando danos ambientais quando liberados, e o CO<sub>2</sub> apresenta propriedades de solubilidade e seletividade comparado a este solvente orgânico (Rizvi *et al.*, 1986). Capuzzo *et al.* (2013) afirmaram que a extração com CO<sub>2</sub> tem uma maior facilidade em extrair compostos apolares e menor em polares, podendo ser melhorado com a presença de co-solventes extratores, por exemplo, com um solvente não-polar. Dean (2010) relatou um aumento da atividade antioxidante e do rendimento de compostos fenólicos dos frutos de *Hymenaea courbaril* com a extração EFS-CO<sub>2</sub>, quando combinado com a água. Dados que corroboram e justificam a utilização do CO<sub>2</sub> nas extrações da nossa pesquisa.

Na análise estatística do planejamento fatorial do rendimento nas extrações supercríticas definitivas, obteve-se que apenas a pressão exibiu diferença significativa na extração dos frutos de *P. pubescens* (EFS-CO<sub>2</sub>) (figura 10), na qual, a combinação entre a maior pressão e menor temperatura, ocorreu maior rendimento do extrato. A cor vermelha escura no gráfico de superfície de resposta

aponta o ótimo de extração com pressão estabelecida entre 105 até 120 bar e temperatura inferior a 15°C.



**Figura 10.** Gráfico de superfície de resposta tridimensional mostrando o efeito das variantes independentes, temperatura e pressão, no rendimento extrativo das extrações por fluido supercrítico.

Esta melhora na atividade com o extrato EFS em promastigotas de *L. amazonensis* pode ser devido à presença dos compostos aromáticos (sesquiterpenos) nos extratos EFS, facilmente identificados no aroma dos extratos e nos cromatogramas. A análise GC-MS dos extratos obtidos pelo EFS-CO<sub>2</sub> em comparação com os dados obtidos para FHe1 (tabela 9) mostrou que o rendimento de recuperação de derivados de vouacapanos foi reduzido em 50%. Contudo, a percentagem de derivados de geranilgeraniol nos extratos obtidos pelo EFS-CO<sub>2</sub> foi superior a do FHe1. Estes resultados justificam a melhora na atividade do extrato de *P. pubescens* obtido por extração supercrítica. O maior efeito inibitório dos protozoários foi provavelmente devido à porcentagem de derivado de geranilgeraniol aumentado nos extratos. As condições de menor temperatura, maior pressão e densidade utilizada no processo de extração supercrítica melhoram a solubilidade de compostos terpeno (da Silva *et al.*, 2016, Glisic *et al.*, 2010).

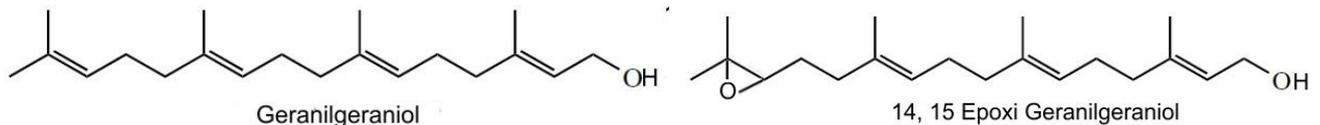
**Tabela 9.** Dados obtidos pelo cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas CG-EM, com os extratos por turboextração (FHe1) e supercrítico (EOe4 a EOe8).

Amostras	Teor (% recuperação)	% derivados de geranilgeraniol	% derivados vouacapanos
FHe1	99,65	71,07	28,92
EOe4	51,63	80,91	19,08
EOe5	42,56	78,56	21,43
EOe6	42,73	82,67	17,32
EOe7	46,02	82,99	17,00
EOe8	51,04	81,68	18,31

Notas: FHe1; fração hexânica por turboextração. EOe's; extratos por EFS-CO<sub>2</sub>.

Menna-Barreto *et al.* (2008) atribuíram a boa atividade na inibição antiprotozoaria em *Trypanossoma cruzi* a presença majoritária do geranilgeraniol na composição de uma fração ativa. E segundo Lopes *et al.* (2012), geranilgeraniol causou alterações no potencial de membrana mitocondrial

e também a fragmentação do DNA de *L. amazonensis*. Resultados que corroboram com o encontrado por Carvalho *et al.* (2008) nos quais mostraram-se que diterpenos apresentam atividade sobre prosmatigotas de *L. chagasi* e sobre amastigotas axênicas. O ácido pinifólico foi mais ativo, seguido pelo caurenóico com  $CI_{50}$  de 4 e 3,5  $\mu\text{g/mL}$ , compostos estes isolados do óleo da *Copaifera* (Santos *et al.*, 2013).

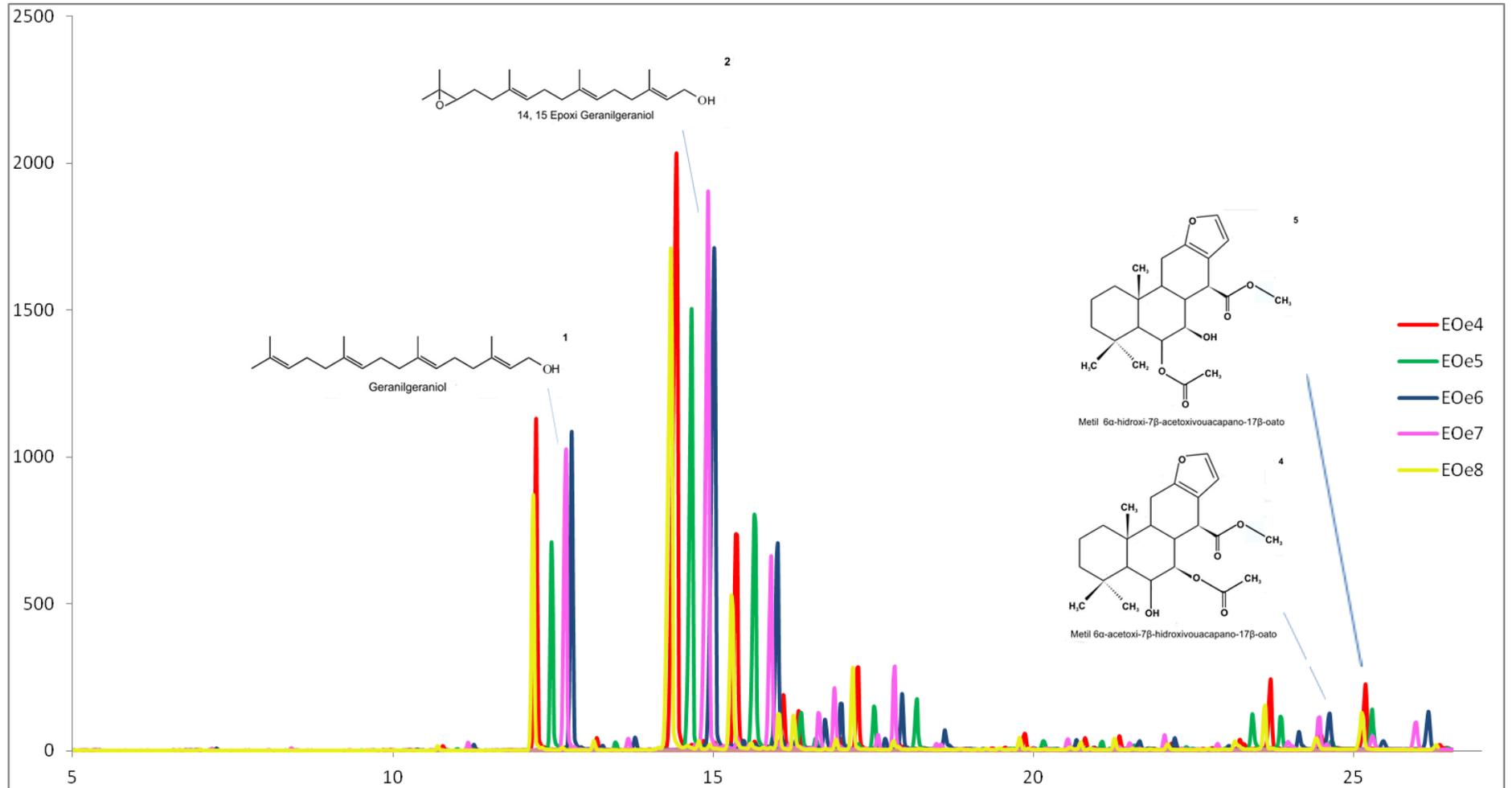


**Figura 11.** Derivados de geraniol presentes nos extratos dos frutos de *P. pubescens*, possivelmente responsáveis pela promissora atividade antileishmania, 1: geranylgeraniol; 2: 14,15 epoxi-geranylgeraniol.

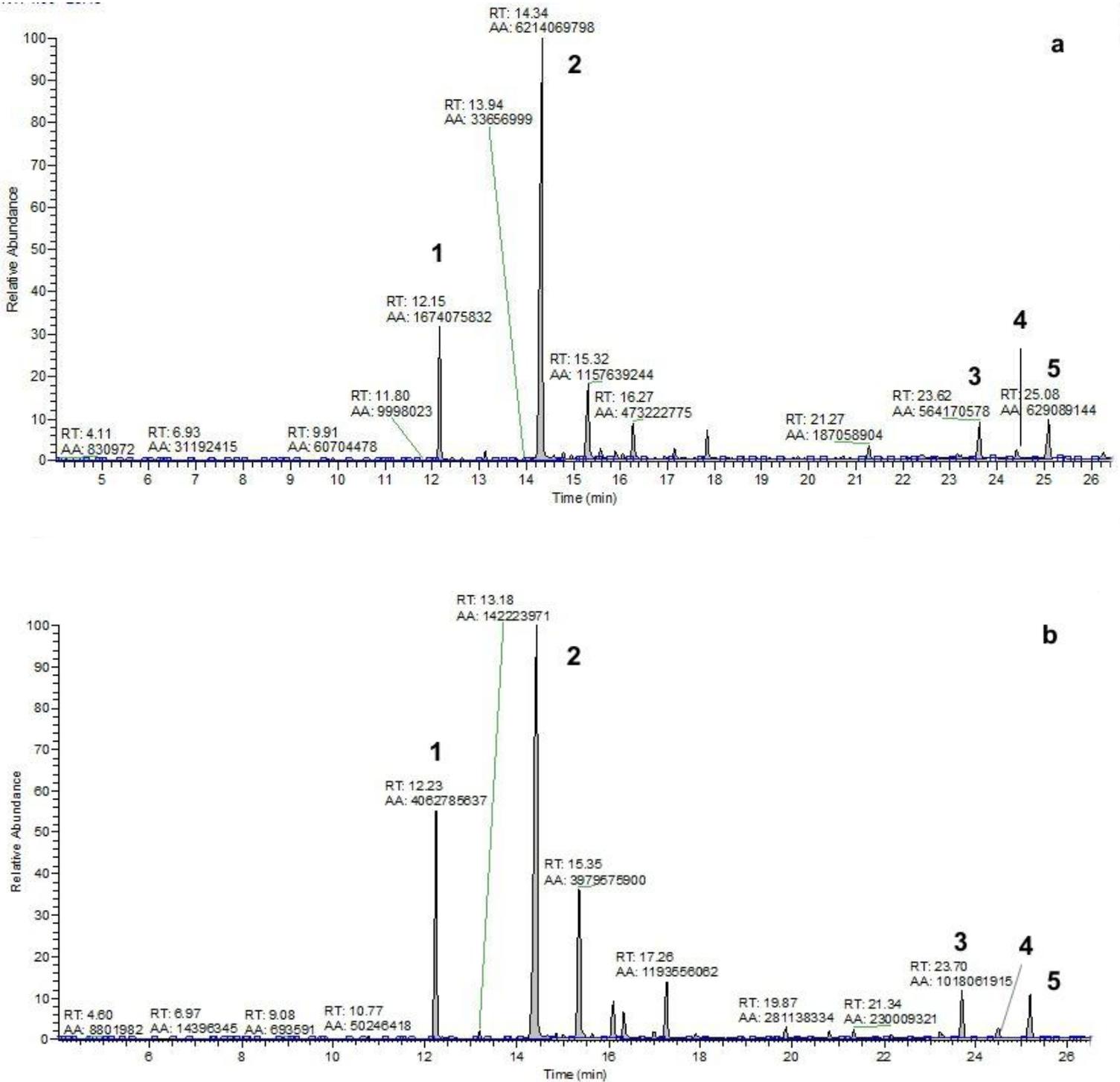
Na fig. 12, pag. 62 é apresentada a quimiometria dos dados obtidos pelo CG/MS, na qual é possível observar a sobreposição e comparação de todos os picos dos constituintes dos extratos. No eixo “y” são as diferentes intensidades dos picos (substâncias) em cada cromatograma de seus respectivos extratos, e no eixo “x” estão descritos os tempos de retenção que ocorreram algumas diferenças em segundos quando comparou-se as corridas dos diferentes extratos, sendo considerado normal, não afetando a identificação dos principais picos de interesse. Dentre os extratos EFS, o EOe4 foi o que apresentou a maior intensidade dos compostos, tanto derivados do geranylgeraniol como dos derivados de vouacapanos. Em geral, os extratos apresentam um tipo de ciclização nos seus componentes, visivelmente notado nos três primeiros maiores picos, no qual quando os dois maiores (geranylgeraniol e epoxi geranylgeraniol) apresentaram uma maior intensidade (EOe4 e EOe7). O terceiro que é um derivado de geraniol (identificação desconhecida) diminui sua intensidade, e o contrário ocorreu quando os dois primeiros picos são menores (EOe5) e o terceiro apresenta uma maior intensidade, mostrando que um composto acaba se transformando em outro, dependendo das mudanças nas variantes de extrações. Seguindo a análise de melhor obtenção dos constituintes, houve uma alternância para o restante dos extratos, obtendo-se uma maior intensidade dos picos para os derivados de geranylgeraniol (faixa de 10 a 20 min), e para os derivados de vouacapanos não houve uma diferença visual nos picos (faixa 21 a 27 min) mostrando que todos os outros estão na mesma faixa de intensidade. Resultados convergentes aos encontrados por Barbosa *et al.* (2014), no qual a concentração de diterpenos extraídos por EFS foi maior quando se utilizou pressão de 140 bar e menor temperatura 40°C, com borra de café expresso.

Todos os cromatogramas a seguir apresentados (fig.13), tanto os obtidos da FHe1 e EOe's, exibiram em geral o mesmo padrão de distribuição dos componentes, perfil químico. O padrão foi de em cerca de 4 a 11 min. identificou-se os aromáticos (sesquiterpenos), de 12 a 18 min os derivados de geraniol (diterpenos lineares) e de 19 a 27 os derivados de vouacapanos (diterpenos ciclícos). Uma justificativa para não ter ocorrido diferenças nas seletividades de extrações dos compostos pelo EFS-

CO<sub>2</sub>, pode ser o fato do intervalo entre as variantes de extrações avaliadas estarem muito próximas, necessitando intervalos maiores para este material vegetal (frutos) ou para esta espécie.

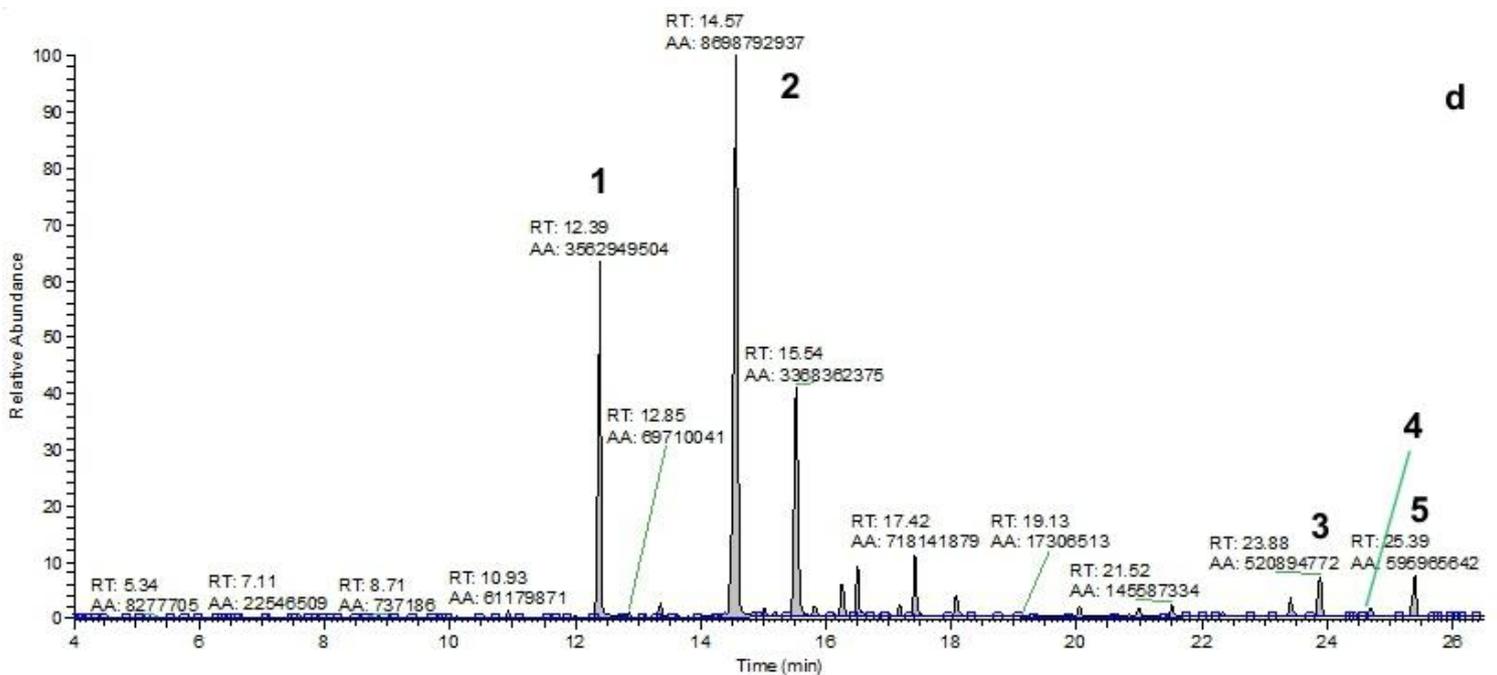
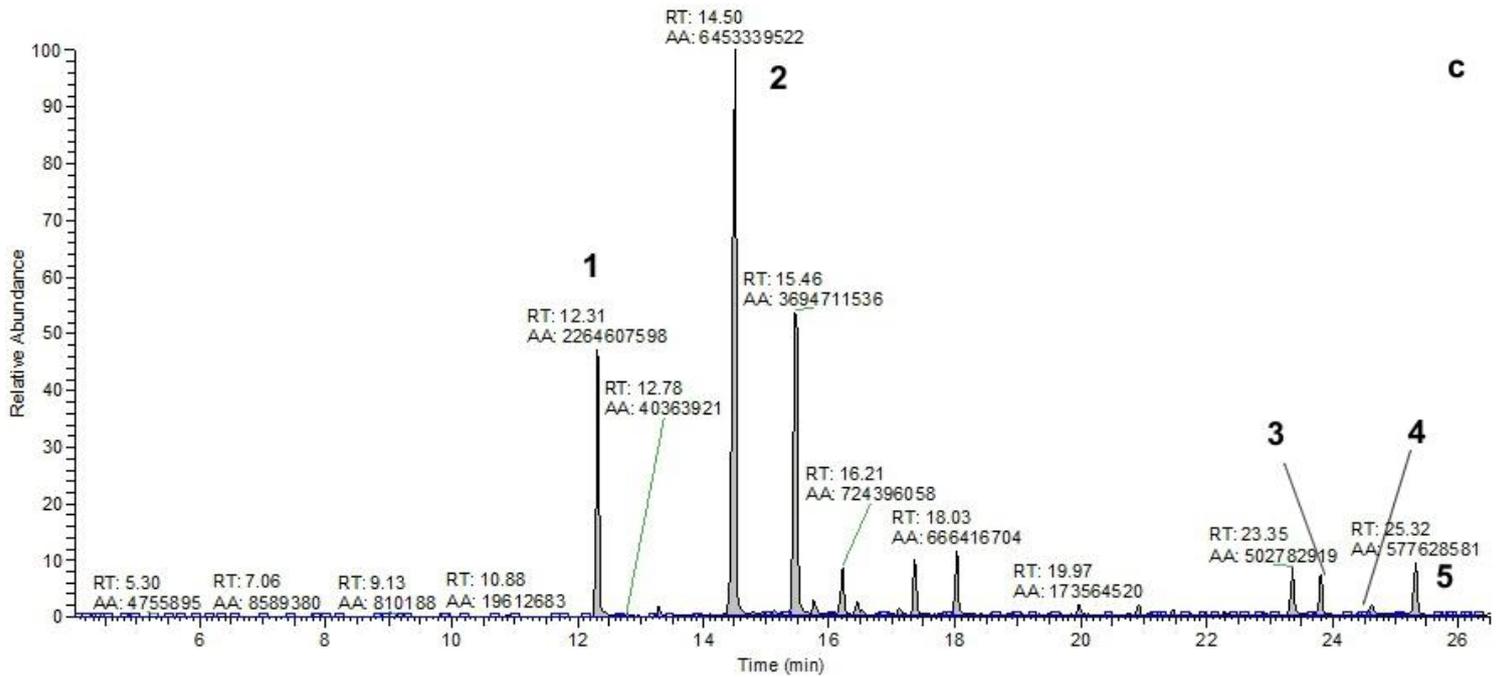


**Figura 12.** Gráfico obtido pelo análise quimiometria de dados obtidos pelo CG-EM de todos os extratos por EFS. Notas: Eixo x: tempo em minutos da corrida obtidos pelo cromatograma do CG-EM; Eixo y: Intensidade de abundância de todos os extratos EOe's.



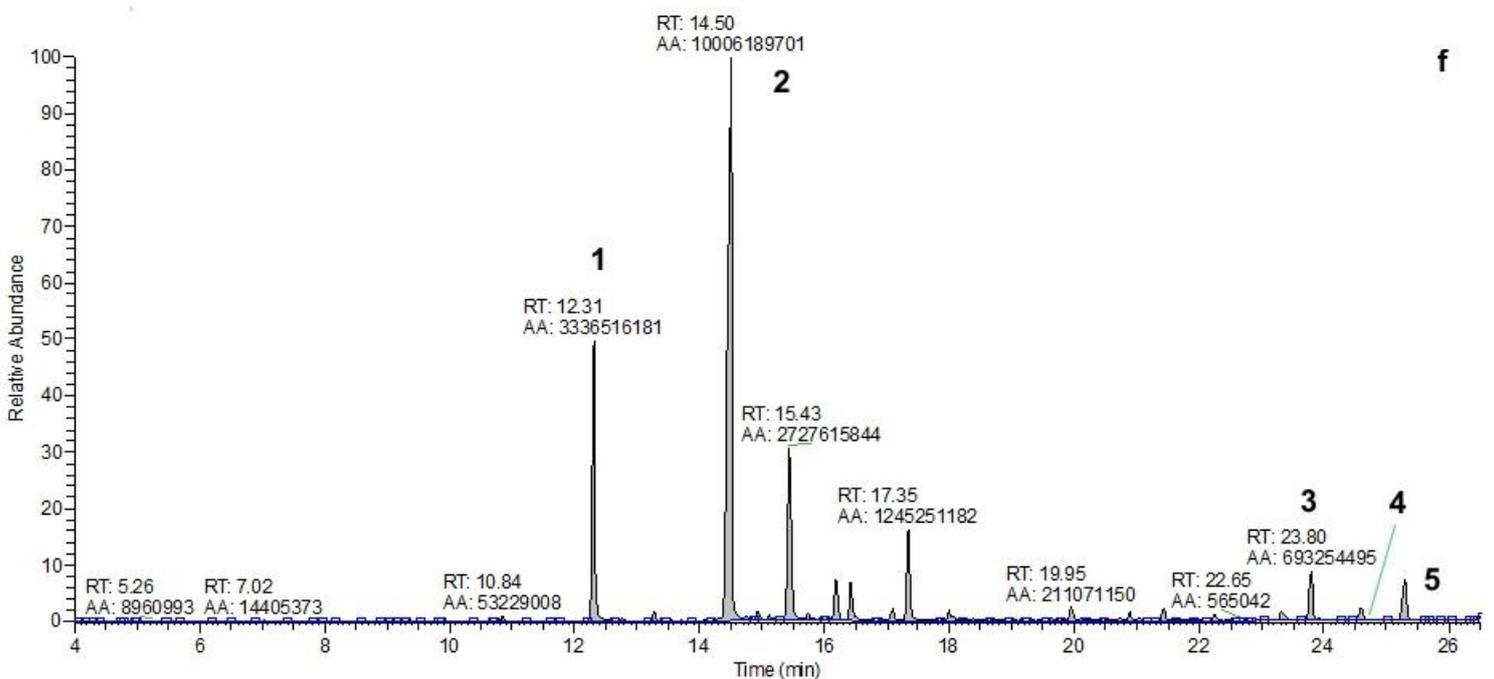
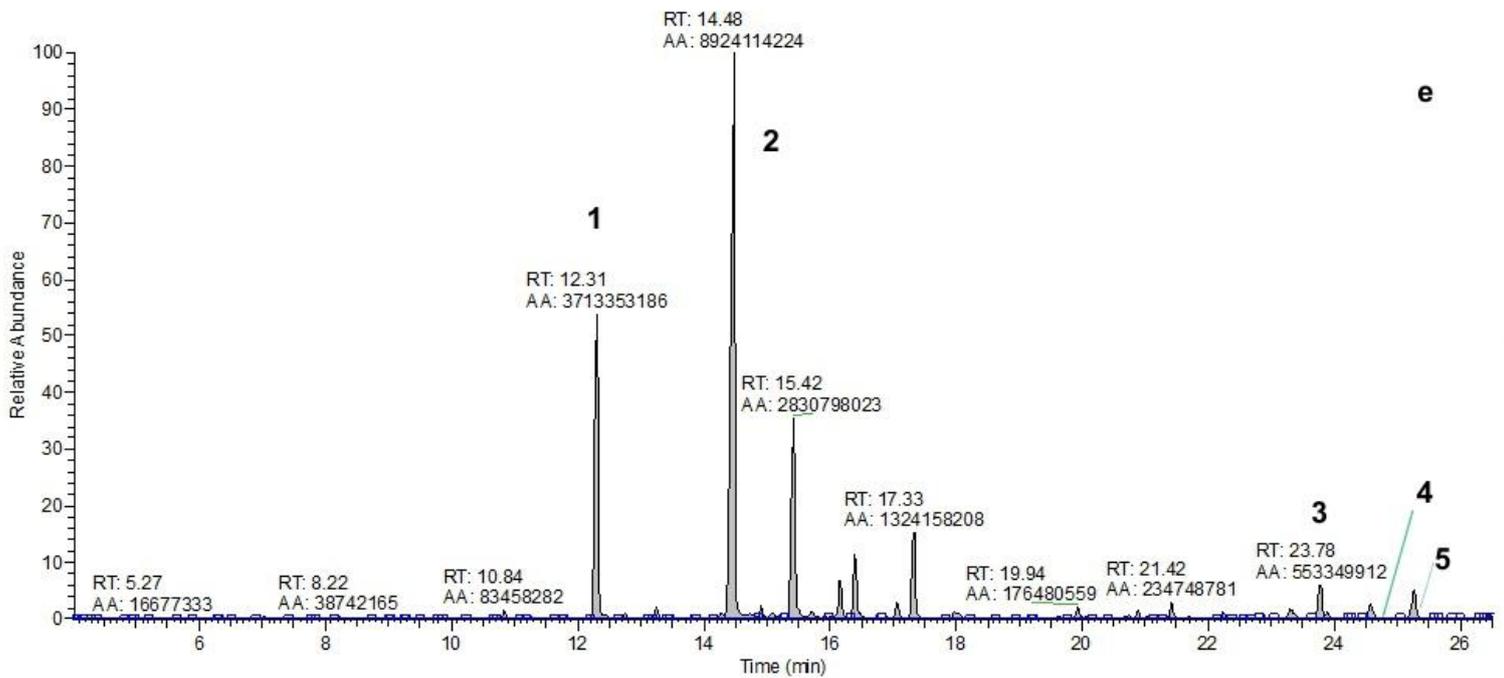
**Figura 13.** Cromatogramas da fração hexânica (turboextração) e dos extratos fluidos supercríticos dos frutos da *P. pubescens*. Notas: cromatograma obtido no CG/MS; a) FHe1; b) EOe4; 1: geranilgeraniol; 2: 14-15 epoxi-Geranilgeraniol; 3: voucapano 1 (não indentificado); 4-5: voucapanos isomeros (metil 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato e o metil 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapano-17 $\beta$ -oato).

Continuação



Notas: Cromatograma obtido no CG/MS; c) EOE5; d) EOE6; 1: geranilgeraniol; 2: epóxi geranilgeraniol; 3: voucapano 1 (não identificado); 4-5; voucapanos isomeros (metil  $6\alpha$ -acetoxi- $7\beta$ -hidroxivoucapano- $17\beta$ -oato e o metil  $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxivoucapano- $17\beta$ -oato). Fonte Hoscheid et al., 2012.

Continuação



Notas: Cromatograma obtido no CG/MS; d) EOE7; e) EOE8; 1: geraniogeraniol; 2: epoxi-geraniogeraniol; 3: voucapano 1 (não identificado); 4-5: voucapanos isômeros (metil 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato e o metil 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapano-17 $\beta$ -oato). Fonte Hoscheid *et al.*, 2012.

### 5.2.2 Testes com os melhores extratos e suas respectivas nanoemulsões

Os resultados na tabela a seguir (tabela 10), são da atividade antiproliferativa sobre a interação macrófagos e amastigotas intracelulares. Na qual avaliamos apenas os extratos que apresentaram as melhores atividades sobre as formas promastigotas, comparando o método EFS com um convencional turboextração (EOe4 e FHe1). O EOe4 mostrou-se superior na atividade sobre as amastigotas intracelulares com uma média da  $CI_{50}$  de 33,8  $\mu\text{g/mL}$ , e a FHe1 apresentou  $CI_{50}$  40,7  $\mu\text{g/mL}$ . Em âmbito geral, os dois apresentaram excelentes resultados sobre amastigotas, com efeitos concentrações-dependentes.

Geralmente se afirma que atividade frente a doenças infecciosas é relevante quando apresentam valores de  $CI_{50}$  inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos brutos de vegetais e abaixo de 25  $\mu\text{M}$  para os compostos isolados (Cos *et al.*, 2006). Colocando *P. pubescens* com potencial para o tratamento de *L. amazonensis*.

Todos os resultados antileishmania apresentados até agora, corroboram em parte com os encontrados por Da Costa *et al.* (2014), nos quais relataram a atividade em promastigotas de *L. amazonensis* com o extrato acetato de etila das raízes de *Conarus suberosus* no qual foi isolado o composto geranilgeraniol. Para Arrais-Silva *et al.* (2014) a atividade antileishmania do extrato das folhas de *P. pubescens*, apresentaram um efeito concentração-dependente decrescente em células infectadas, reduzindo significativamente o número de amastigotas de 1,2 amastigotas/células a 600  $\mu\text{g/mL}$  de extrato, comparado com o controle de 3,3 amastigotas/células, não afetando a viabilidade celular no fim do teste. Cavalcante *et al.* (2014) afirmaram que o extrato etanólico de folhas de *P. emarginatus* apresentaram atividade frente a promastigotas de *L. infantum chagasi*, sendo identificadas flavonas e saponinas como constituintes principais e ausência de terpenoides. No entanto, Toledo *et al.* (2011) encontrou uma baixa atividade sobre promastigotas de *L. amazonensis*, com um  $CI_{50}$  de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , com o extrato bruto dos frutos de *P. emarginatus* turboextraído com cachaça brasileira.

Ainda relacionado a tabela 10, mostram o quão potencial os sistemas de liberação modificadas dos fármacos podem melhorar a atividade antileishmania. Estes sistemas nanoestruturados diminuíram drasticamente as  $CI_{50}$  para 1,9 e 2,7  $\mu\text{g/mL}$  com N.EOe4 e N.FHe1, respectivamente, uma queda na razão entre as concentrações de 18 vezes para a N.EOe4 e 15 vezes para a N.FHe1. Para apresentar o mesmo efeito dos extratos não formulados ( $CI_{50}$ ), valores próximos aos encontrados pelo padrão positivo miltefosina, que apresentou um  $CI_{50}$  de 0,7  $\mu\text{g/mL}$ , efeito concentração-dependente. Resultados estes que evidenciam que esta nanotecnologia aumenta, e muito, o poder de penetração e de distribuição, e conseqüentemente aumentando assim sua atividade. Este aumento na penetração é conseguido, pois as NE conseguem chegar ao alvo com maior eficiência, alvejando lugares não alcançados anteriormente. Estes resultados só ajudam a reforçar o grande potencial antileishmania que os

frutos de *P. pubescens* apresentam, com potencial de se tornar um fármaco efetivo no tratamento desta zoonose com estudos mais aprofundados. Por se tratar de resultados com extratos brutos de vegetais, são muito significantes, uma vez que não são substâncias isoladas, resultados estes que podem ser ainda melhorados com estudos de isolamento e identificação dos constituintes dos frutos, responsáveis pela atividade.

Os resultados apontam que para inibir 90% das amastigotas precisou-se de concentrações abaixo das encontradas para inibir 50% com os extratos oleaginosos, ou seja, mostraram o grande potencial com NE dos extratos na inibição das formas amastigotas intracelulares. Os resultados foram uma  $CI_{90}$  de 23,9 para a N.FHe1 e 9,3  $\mu\text{g/mL}$  para a N.EOe4, sendo a última muito mais ativa, necessitando de uma concentração 2,6 vezes menor, para apresentar o mesmo efeito antiproliferativo sobre leishmania. Não encontramos os  $CI_{90}$  dos extratos oleaginosos (FHe1 e EOe4), pois, inibiram no máximo 70% dos protozoários com as concentrações testadas (abaixo de 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

Comparando-se as duas NE (N.EOe4 e N.FHe1) já era esperado que o extrato EFS- $\text{CO}_2$  apresentasse a melhor atividade, pelos resultados obtidos e discutidos nos testes anteriores, mas a diferença entre as atividades caiu de 7  $\mu\text{g/mL}$  ( $CI_{50}$ ) no teste de interação entre macrófagos e amastigotas intracelulares com os óleos para apenas 0,8  $\mu\text{g/mL}$  na atividade com as NE, uma redução significativa nas concentrações inibitórias.

**Tabela 10.** Atividade da FHe1 e EOe4 e suas respectivas nanoemulsões em amastigotas intracelulares.

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV	$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV
FHe1	40,7 $\pm$ 2,9	0,07	ND	ND
EOe4	33,8 $\pm$ 4,6	0,14	ND	ND
N.FHe1	2,7 $\pm$ 0,10	0,05	23,9 $\pm$ 1,91	0,08
N.EOe4	1,9 $\pm$ 0,30	0,17	9,3 $\pm$ 0,04	0,01
Miltefosina	0,7 $\pm$ 0,02	0,02	ND	ND

Notas: FHe1; fração hexânica turboextraída, EOe4: extrato EFS- $\text{CO}_2$  (120 P/20 T); N.FHe1: nanoemulsão da fração hexânica (turboextração); N.EOe4: nanoemulsão do EFS- $\text{CO}_2$ ;  $\pm$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação; ND: não determinado.

Para esta melhora na atividade antileishmania com as NE sugere-se dois principais motivos. O primeiro pelo menor tamanho das gotículas e segundo, pela sua maior biodisponibilidade que estes sistemas apresentam, liberando de forma gradual e eficiente seus constituintes. De acordo com Shakeel *et al.* (2008), estudos farmacocinéticos demonstraram que NE podem ser utilizados com eficiência como veículos melhorando e potencializando a permeação dérmica e a biodisponibilidade de drogas que são difíceis de solubilizar.

Os dados apresentados a seguir na tabela 11 são os das características estruturais das NE. Apresentaram densidades próximas, apesar dos extratos terem sido obtidos de metodologias diferentes (N.FHe1: turboextração; N.EOe4: EFS- $\text{CO}_2$ ). A N.EOe4 apresentou um menor tamanho médio com cerca de 185 nm comparada com 199 nm da N.FHe1. E em relação à

polidispersão, a da N.FHe1 foi menor 0,120 contra 0,170, revelando que quanto menor for a polidispersão, menor são as chances das partículas das NE se agruparem, mostrando que os sistemas tem uma distribuição de partículas homogêneas. Sabe-se que quanto menor a polidispersão do sistema, menor são as chances das gotículas das NE coalescerem. Ambas as amostras apresentaram, por DLS, um perfil de distribuição monomodal e estreita distribuição de tamanho de partículas, com PDI < 0,3, o que indica a fidelidade do sistema desenvolvido e reflete a estabilidade (Li e Ge, 2012).

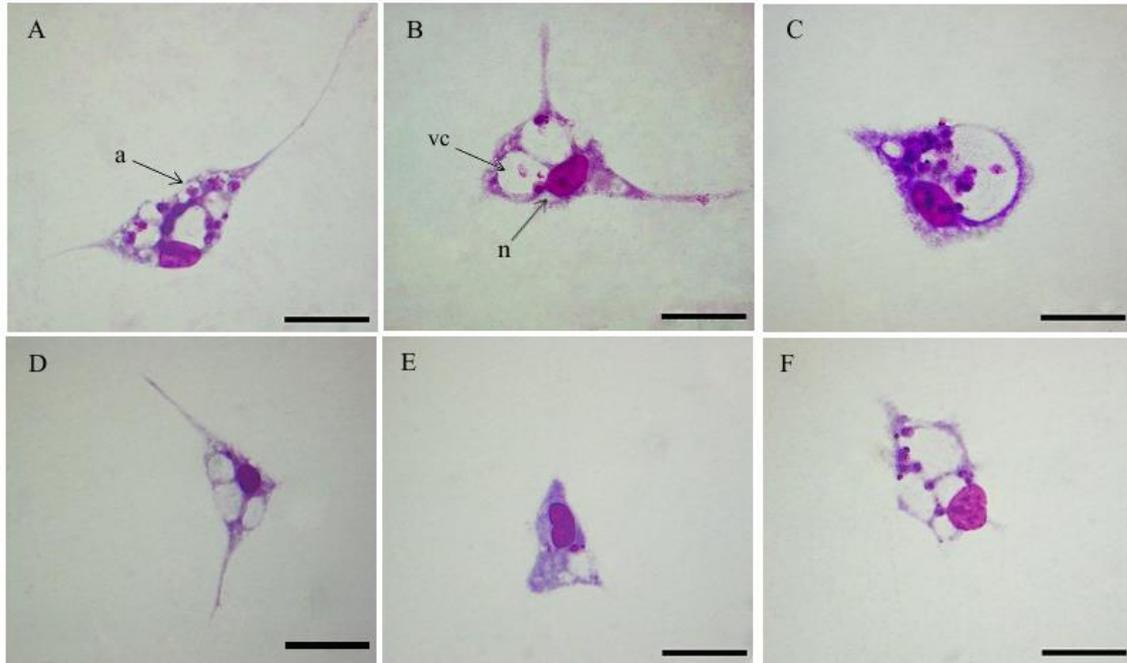
**Tabela 11.** Características das NE testadas frente a formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Amostra	Densidade (g/mL)	Tamanho médio (nm)	Polidispersão
N.FHe1	0,87	199	0,12
N.EOe4	0.81	185	0,17

Notas: N.FHe1: nanoemulsão da fração hexânica (turboextração); N.EOe4: nanoemulsão do extrato EFS-CO<sub>2</sub>; nm: nanômetros. Fonte: dados da N.FHe1 - Hoscheid *et al.*, 2015.

Nanoemulsões são sistemas de liberação adequados para a distribuição eficiente dos seus ativos, graças as grandes áreas de sistemas emulsionados permitindo maior superfície de contato, facilitando a penetração dos seus ativos (Mezadri, 2010), o que é auxiliado com o menor tamanho das gotículas. Além de ser um excelente sistema de transporte e entrega de fármacos (Ospina *et al.*, 2014), e pontencializador da atividade farmacológica de um fármaco. De acordo com pesquisadores, atualmente NE vem sendo estudadas para direcionar quimioterápicos especificamente, à células neoplásicas evitando assim toxicidade e aumentando a eficiência do tratamento (Saldanha *et al.*, 2012).

A figura 14, constata a atividade antiproliferativa das NE contra as formas amastigotas intracelulares, no ensaio de interação com macrófagos. É possível notar que esta atividade foi concentração-dependente, com o aumento de inibição conforme o aumento das concentrações das NE. É visível que os macrófagos foram infectados por conter vacúolos parasitóforos, que têm como ação principal pinocitar partículas estranhas e destruí-las, mostrando a efetividade das drogas testes, no qual tiveram a capacidade de inibir os protozoários dentro dos macrófagos, sem matar as células hospedeiras.



**Figura 14.** Fotos obtidas pelo microscópio óptico, do ensaio de interação entre amastigotas e macrófagos peritoneais, tratados com as NE. A: controle negativo; B e C: tratados com N.FHe1 10 e 0.5 µg/mL, respectivamente; D: tratados com Miltefosina (0.7 µg/ml); E e F: tratados N.EOe3 5 e 0.5 µg/mL, respectivamente; a: amastigota; vc: vacúolos citoplasmáticos; n: núcleo; Escala 20 µm.

Nanoemulsões antimicrobianas são dirigidas para fundir-se com organismos contendo lipídeos, sendo reforçada pela atração eletrostática entre a carga catiônica da NE e aniônica do agente patogênico. Quando as NE atingem seus alvos, libertam parte da energia do seu interior, e as substâncias desestabilizam o agente patogênico o que resulta na lise e morte celular (Mnimbs, 2015).

Segundo Caldeira *et al.* (2015) as NE carregadas com Anfotericina B, com e sem esterealiamina diminuíram significativamente a citotoxicidade em macrófagos *in vitro*, mantendo uma excelente atividade com  $CI_{50}$  de 0,11 e 0,21 µg/mL, respectivamente, apresentando uma boa estabilidade de 180 dias. Resultados convergentes aos encontrados por Araújo (2013), que não encontrou diferença estatística no teste frente promastigotas de *L. chagasi* entre a NE de Anfotericina B com formulações de Anfotericina micelar, porém o autor indaga que testes em amastigotas e de citotoxicidade podem apresentar resultados mais promissores. Outra NE formulada com chalcona sintética vinculada contra *L. amazonensis*, apresentou um efeito frente à amastigotas com  $CI_{50}$  de 1,13 µg/mL, com um alto índice de seletividade no ensaio de citotoxicidade, o que é o ideal para drogas no tratamento de uma doença infecciosa. As NE têm grande potencial para o tratamento parenteral das leishmanioses (De Mattos *et al.*, 2015). Ospina *et al.* (2014), observaram que uma NE carregada com ftolocianina de alumínio clorada, do tipo o/a, para o tratamento de leishmaniose cutânea, não atravessou a pele em um ensaio *ex vivo*, sugerindo que estudos em animais com LC são

necessários resultados mais elaborados. Para Pinto *et al.* (2013), uma emulsão lipídica de miltefosina apresentou excelentes resultados contra formas promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. chagasi*. NE com Antimoniato de meglumina afetou a viabilidade celular de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. com  $CI_{50}$  148 e 88  $\mu\text{g/mL}$  e a diminuição do efeito tóxico em macrófagos, com o sistema nanoemulsionado (Santander Vásquez, 2010). Estes trabalhos evidenciam que as NE podem ser aplicadas a fármacos que por algum motivo perderam suas funções e propriedades originais, ou em casos de resistências adquiridas pelos protozoários, conferindo novamente aos mesmos atividade.

Outra vantagem encontrada com as NE com os óleos dos frutos de *P. pubescens* é a estabilidade que elas apresentaram, no qual foram armazenadas por 14 meses sem apresentar nenhuma alteração visível na separação das fases. Comparada com o óleo fixo bruto dos frutos da sucupira, que apresentaram uma maior taxa de degradação sob as mesmas condições, sendo necessário armazenamento em temperaturas baixas para sua conservação. Além das NE se apresentarem estáveis, graças a redução no tamanho das partículas, e conseqüentemente redução da agregação entre as moléculas. Hoscheid (2016) demonstrou que as NE com a FHe1 se mostraram mais estáveis em um ano em câmara climatizadora, mantendo cerca de 94% dos seus ativos, comparada apenas com o óleo fixo da fração hexânica que degradou rapidamente a temperatura ambiente. Co-surfactantes são utilizados em NE para a estabilização, tornando-as mais estáveis (De Mattos *et al.*, 2015).

Descrito por Mukbel, (2005) os macrófagos fazem parte da defesa imune inata dos humanos, que têm como objetivo reconhecer uma partícula estranha, por seus receptores de superfície e subsequentemente, fagocitar estas partículas, mediando a destruição e eliminação de patógenos. As leishmanias se adaptaram a viver dentro dos macrófagos por mecanismos de resistência, e acabam matando-os após a sua multiplicação. No ensaio de citotoxicidade em macrófagos, ambos os métodos de extração apresentaram o efeito de citotóxico (tabela 12), muito próximo ao efeito inibitório contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, ou seja, o índice terapêutico está muito próximo. O índice terapêutico que é uma mensuração da segurança de um fármaco, pois um elevado índice indica uma grande margem entre as concentrações que são efetivas e as que são tóxicas (Clark *et al.*, 2013), as chances de curar 50% dos indivíduos está muito próxima das chances de matar 50% de uma dada população hipoteticamente tratada. Os IS apresentados mostram que a FHe1 foi mais tóxico comparado ao EOe4, por apresentar um índice de seletividade menor, 0,87 contra 1,05, sendo mais seletivo em inibir o protozoário ao invés dos macrófagos.

Com o intuito de aumentar a  $CC_{50}$  dos extratos formulamos as NE, obtivemos que estes sistemas de liberação modificados aumentaram a citotoxicidade no mesmo patamar do aumento da atividade antileishmania (tabela 12). Visto que um importante critério na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico contra *L. amazonensis* é determinar a ausência de

efeitos tóxicos nas células dos hospedeiros empregando o índice de seletividade, que consiste na razão entre a  $CC_{50}$  para células J774A1 e o  $CI_{50}$  para protozoários (Nakamura *et al.*, 2006), revelando assim que os compostos têm ação preferencialmente sobre os protozoários ou contra as células de defesa dos hospedeiros. Porém, em relação ao IS, ocorreu uma leve melhora quando comparada aos extratos oleaginosos de *P. pubescens*, em cerca de 1,5 vezes mais seletivo para a N.FHe1 e 1,6 para a N.EOe4, quase dobrando os valores.

**Tabela 12.** Ensaio de citotoxicidade em macrófagos ( $CC_{50}$ ), dos três extratos na otimização de um método extrativo.

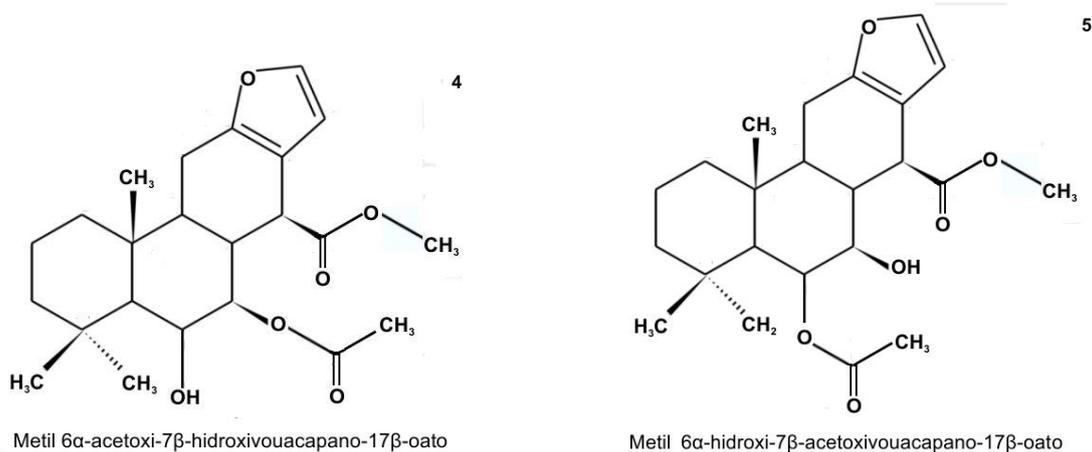
Amostras	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV	IS
FHe1	$35,3 \pm 1,5$	0,04	0,87
EOe4	$35,5 \pm 0,5$	0,01	1,05
N.FHe1	$3,7 \pm 1,0$	0,27	1,37
N.EOe4	$3,2 \pm 0,6$	0,19	1,68
Miltefosina	$22,4 \pm 0,8$	0,03	32

Notas: FHe1: Fração hexânica turboextraída; FHe2: Fração hexânica macerada; EOe4: Extrato EFS- $\text{CO}_2$  (T20 P120); N.FHe1: nanoemulsão da fração hexânica (turboextração); N.EOe4: nanoemulsão do EFS- $\text{CO}_2$ ;  $\pm$ : Desvio Padrão; CV: Coeficiente de Variação; IS: Índice de seletividade.

De acordo com a literatura, diterpenos furânicos vouacapanos cíclicos são os principais compostos em *Pterodon* sp. capazes de provocar a citotoxicidade em células de tumorais (fig.15) (Vieira *et al.*, 2008; Spindola *et al.*, 2009), podendo explicar esta citotoxicidade em macrófagos. Trabalhos estes convergentes ao encontrado por Toledo *et al.* (2011), no qual encontrou atividade citotóxica contra células VERO, com o extrato bruto dos frutos de *P. emarginatus* turboextraídos com cachaça, apresentando um  $CC_{50}$  33,67  $\mu\text{g/mL}$ .

No entanto, estudos com óleos de *P. pubescens* não relataram qualquer toxicidade em animais (Sabino *et al.* 1999; Coelho *et al.* 2001), ou mudanças em quaisquer parâmetros fisiológicos ou hematológicas e diminuição do número de leucócitos e células mononucleares (Hoscheid *et al.*, 2013). Ressaltando o fato de que nem todos os compostos presentes nos extratos dos frutos de *P. pubescens* são conhecidos, não descartando a possibilidade de a ação citotóxica ser por responsabilidade dos mesmos ou devido ação sinérgica entre os constituintes já conhecidos. O óleo essencial de *Bixa orellana* apresentou em sua constituição 9,1% de geranilgeraniol. O óleo não apresentou efeito citotóxico contra macrófagos peritoneais (Monzote *et al.*, 2014). De acordo com o estudo acima, podemos excluir o geranilgeraniol (fig. 11, pag. 61) como possível causador deste efeito citotóxico.

Há relatos na literatura sobre atividade de NE aumentando sua citotoxicidade em células tumorais (Desai *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009), que é uma citotoxicidade boa, por eliminar células de câncer dos organismos que se proliferaram de forma descontrolada, tendo como objetivo diferente da citotoxicidade do nosso trabalho, que tem como principal função avaliar se as drogas testes matarão ou não as células dos HO.



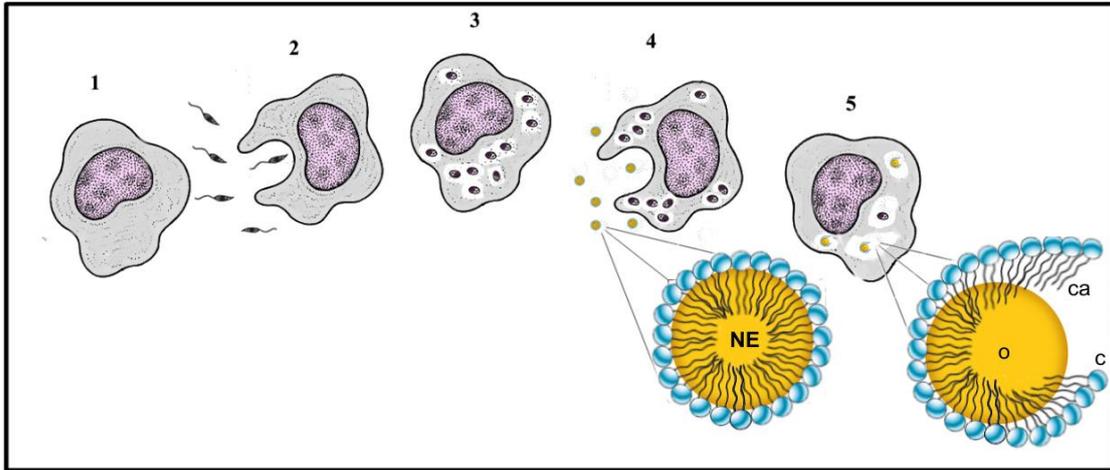
**Figura 15.** Derivados de vouacapanos presentes nos extratos dos frutos de *P. pubescens*, possivelmente responsáveis pela citotoxicidade. 4 e 5; vouacapanos isômeros (Metil 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxivouacapano-17 $\beta$ -oato e o Metil 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapano-17 $\beta$ -oato). Fonte Hoscheid *et al.*, 2012.

Uma das opções que vemos como viável para melhorar a atividade dos EFS, tentando diminuir as  $CI_{50}$  nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e aumentar sua  $CC_{50}$  frente aos macrófagos, seria encontrar condições no fluido supercrítico favoráveis a não extração destes compostos citotóxicos presentes nos extratos da *P. pubescens*. Porém, para a confirmação dessa hipótese, serão necessários novos estudos, como o isolamento e confirmação dos verdadeiros responsáveis pela citotoxicidade.

Um aspecto exclusivo das NE é a toxicidade seletiva para microrganismos nas concentrações que não são irritantes para a pele ou para as mucosas, testados em animais e em ensaios clínicos em humanos. A margem de segurança da NE é conseguida devido ao baixo nível de emulsificante em cada gota, porém quando agem em conjunto, essas gotículas têm energia e surfactante suficientes para desestabilizar os microrganismos alvos sem danificar as células saudáveis dos hospedeiros (Mnimbs, 2015). Sendo uma alternativa para futuros testes (N.EOe4), formular o creme de aplicação dérmica *in vivo* sobre leishmaniose.

O esquema a seguir apresenta desde a infecção dos macrófagos peritoneais até hipotética liberação das drogas através das nanoemulsões (figura 16). Na etapa 1 temos o macrófago antes da infecção (o controle); na etapa 2 ocorre a infecção com formas promastigotas de *L. amazonensis* que é conseguida através da fagocitose dos protozoários (mecanismo de defesa da célula imunológica). Na etapa 3 após a infecção, inicia-se a diferenciação dos protozoários de promastigotas em amastigotas, seguidas de suas multiplicações. Em 4 ocorre o contato das nanoemulsões com finalidade antiproliferativa, as partículas são internalizadas pelo mesmo mecanismo de fagocitose ou também, atravessando a membrana plasmática do macrófago. Este mecanismo pode ser a resposta chave do aumento da atividade com as nanoemulsões, uma vez que quanto menor as partículas, maior é o seu poder de penetração nas células alvos. Após, a nanoemulsão é liberada podendo atuar inibindo possivelmente a multiplicação dos protozoários

como também a destruição das existentes (etapa 5), como também a liberação de forma gradual é um dos atrativos dos sistemas nanoestruturados, aumentando assim a sua biodisponibilidade, apresentando maiores efeitos.



**Figura 16.** Hipótese da ação das nanoemulsões frente às formas amastigotas (interação com macrófagos) de *L. amazonensis*. -Notas: o: óleo dos frutos de *P. pubescens*; c: cabeça do tensoativo; ca: cauda do tensoativo. Fonte: Santos 2016.

Outra vantagem das NE neste estudo foi a grande economia de extratos necessários para o preparo de quantidades relevantes, o que leva a um impacto muito menor, no caso uma espécie com risco de extinção. Além de agredir menos o meio ambiente precisando de menos material vegetal. Na indústria farmacêutica se preza muito a economia de matérias primas. Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos têm todos os requisitos para mudar e impactar de forma positiva a produção e desenvolvimento de fármacos, em várias áreas incluindo a de antiprotozoários, pela sua melhora na eficiência como na economia na produção.

## 6 CONCLUSÃO

Com os dados expostos e discutidos conclui-se que quando se comparou metodologias de extrações com o objetivo de otimizar a atividade antileishmania, os extratos por fluidos supercríticos se mostraram mais ativos sobre as formas promastigotas e amastigotas intracelular.

As NE aumentaram de forma significativa a atividade dos melhores extratos, principalmente com a N.EOe4 em amastigotas intracelular. Além de aumentar o índice de seletividade do  $CC_{50}$ , colocando a *P. pubescens* como potencial para o desenvolvimento de um fármaco antileishmania. Estes resultados foram conseguidos, possivelmente pelo seu menor tamanho, maior penetração, distribuição e biodisponibilidade dos extratos com as NE.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Faz-se necessário novos estudos para a identificação dos compostos do(s) causador(es) da citotoxicidade e ainda, modelos *in vivo* são necessários para confirmação dos resultados positivos com *P. pubescens* no tratamento das leishmanioses.

## REFERÊNCIAS

- ABISMAIL, B. *et al.* Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, n. 1, p. 75-83, 1999.
- ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9**. Artmed Editora, p.716,2013.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMATO, V. S. *et al.* Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Trop**, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ANASTAS, P.; WARNER, J. Green chemistry. **Theory and Practice, Oxford University Press Frontiers**, 30p. 1998.
- ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active componentes – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462–468, 2005.
- ANTUNES, A. M. D. S. **Setores da indústria química orgânica**. Editora E-papers, 242 p., 2007.
- ANVISA. **Farmacopeia brasileira**. 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em: 12/08/16.
- ARAÚJO, G. M. F. 2013 **Nanoemulsões de anfotericina B: desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida**. [Dissertação de mestrado] Campina Grande, PE, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.
- ARRAIS-SILVA, W. *et al.* Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodon pudescens*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 561-565, 2014.
- ARRUDA, M. **Leishmaniose**. 2014. Disponível em: <[http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos\\_1258562831/6365\\_cr\\_mv-pr\\_manual-zoonoses\\_leishmanioses.pdf](http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1258562831/6365_cr_mv-pr_manual-zoonoses_leishmanioses.pdf)>. Acesso em: 14/10/15.
- ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Bookman Editora, 1048 p., 2011.
- AUTO, H. J. D. F.; CONSTANT, A. B.; CONSTANT, J. M. C. **Antibióticos e quimioterápicos**. Universidade Federal de Alagoas, 373 p., 2008.
- BAGNATO, V. S. **As Novas Técnicas Ópticas para as Áreas da Saúde**. Editora Livraria da Física, 239 p., 2008.
- BARAN, R.; NAKAMURA, R. **Doenças da Unha: do diagnóstico ao tratamento**. Elsevier Brasil, 272 p., 2012.
- BARBOSA, H. M. *et al.* Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, p. 165-172, 2014.

- BARROS, E.; BARROS, H. M. **Medicamentos na prática clínica**. Artmed Editora, 938 p., 2010.
- BEHRMAN, R. E. R. E.; KLIEGMAN, R. M.; JENSON, H. B. **Nelson tratado de pediatria, vol.1**. v. 18, 772 p., 2005.
- BISBY, F. **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**. CRC Press, 1180 p., 1994.
- BOGOTÁ, M. D. L. P. S. **Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Leishmaniasis**. 57 p., 2010.
- BOTINI, N. et al. Estudo etnobotânico das espécies *Bowdichia virgilioides* e *Pterodon pubescens* na comunidade salobra grande município de Porto Estrela, MT. **Biodiversidade**, v. 14, n. 2, p.19 - 31, 2015.
- BOWMAN, D. **Parasitologia veterinária de Georgis**. Elsevier Brasil, 448 p, 2010.
- BRANDÃO, M. **Plantas medicinais e fitoterápicos**. Dataplant- Univesidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Editora do Ministério da Saúde, 2014.
- BRASÍLIA. **Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, 2000.
- BULLEY, N. et al. Supercritical fluid extraction of vegetable oil seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 8, p. 1362-1365, 1984.
- BUSTAMANTE, K. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel), Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.
- CALDEIRA, L. R. et al. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 125-131, 2015.
- CALIXTO, J. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.
- CAMPOS, J. F. D. F. **2008 Ação leishmanicida in vitro da miltefosine em formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) guyanensis, Leishmania (Viannia) braziliensis e estudo in vivo de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental**. [Dissertação de mestrado], Brasília, DF, Universidade de Brasília, 2008.
- CAPUZZO, A.; MAFFEI, M. E.; OCCHIPINTI, A. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 7194-7238, 2013.

CARRARA, V. D. S. et al. HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalago* L. with antileishmanial activity. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 15-33, 2011.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid in analytical chemistry. I. Supercritical fluid chromatography: thermodynamic definitions. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.

CARVALHO, C. et al. Diterpeno com atividade anti-leishmania isolado de folhas de *Aristolochia cymbifera* (Aristolochiaceae). **31ª Reunião Anual da SBQ. Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia**, v. 26, 2008.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão Anti-Leishmania immune response and evasion mechanisms. **Vitae Academia Biomédica Digital**, n. 25, p.10, 2005.

CASTRO, W. D. **2011. Miltefosina exerce sua ação leishmanicida através do receptor de PAF. [Dissertação de mestrado]**. Ouro Preto, SP, Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.

CAUDE, M.; THIÉBAUT, D. **Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction**. Harwood Academic Publishers, p.456, 1999.

CAVALCANTE, G. S. et al. Prospecção fitoquímica e avaliação de atividade biológica das folhas de Sucupira-Branca – *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae). **54 Congresso de Química, CBQ Química e Sociedade**, 2014.

CDC, C. F. D. C. A. P. **Leishmaniasis: Parasite Biology**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em 25/5/15.

CLARK, M. A. et al. **Farmacologia Ilustrada**. Artmed Editora, 624 p., 2013.

COELHO, C.; CARVALHO, A. **Manual de Parasitologia Humana**. Canoas: Ed. da Ulbra, v. 2, 263 p., 2005.

COELHO, L. P. et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1, p. 109-116, 2005.

COELHO, M. G. P. et al. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2, p. 159-164, 2001.

CORRÊA, M. F. P.; DE MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Dados**, v. 2, p. 5.0, 2008.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COSTA FILHO, A. V. D.; LUCAS, I.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.

COSTA, J. F. A. 2013. **Avaliação da influência da natureza da matriz sólida sobre a extração supercrítica de óleos vegetais.** [Dissertação de mestrado], Belém, PA, Universidade Federal do Pará, 2013.

COUTO, A.; VITORINO, J.; SILVA, R. D. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. "*BRESOLIN, TMB; CECHINEL FILHO, V*". **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar.** Itajaí: Santos, p. 241-308, 2010.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2010.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet.** John Wiley & Sons, 384 p., 2008.

DA COSTA, R. C. et al. Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 135-140, 2014.

DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. **Pesquisa e desenvolvimento de tecnologia supercrítica: Fronteiras da Engenharia Química** E-papers Serviços Editoriais, 2005.

DA SILVA, I. D. et al. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

DA SILVA, R. P., et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v.76, p.40-51, 2016.

DE LUCIA, R. **Farmacologia Integrada.** Clube de Autores, 378p, 2008.

DE MATTOS, C. B. et al. Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5529, 2015.

DE OMENA, M. C. et al. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 6, n. 2, p. 216-22, 2006.

DEAN, J. R. **Extraction techniques in analytical sciences.** In: (Ed.): John Wiley & Sons, v.34, 2010. cap. Capítulo 10 Supercritical Fluid Extraction, p.197-207.

DEDET, J.-P. Current status of epidemiology of leishmaniasis. In: (Ed.). **Leishmania: Springer**, 2002. p.1-10.

DEL PINO, D. 2013. **Tratamentos atuais para leishmaniose.** [Monografia], Curitiba, PR, Universidade Federal do Paraná, 2013.

DESAI, A.; VYAS, T.; AMIJI, M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2745-2756, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DEVARAJAN, P. V.; JAIN, S. **Targeted drug delivery: concepts and design**. Springer, 790p, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons, 539p, 2013.

DIAS, A. K. C.; BARBIÉRI, R. S.; CARDOSO, M. D. G. Avaliação fitoquímica e análise de extratos de *Pelicourea rigida* (douradinha)–Um estudo preliminar. **Revista Cientista Faminas**, v. 1, n. 1, p. 13-19, 2005.

DIAZ-MAROTO, M. C.; PEREZ-COELLO, M. S.; CABEZUDO, M. D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: comparison with simultaneous distillation–extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 947, n. 1, p. 23-29, 2002.

DNDI. **Leishmaniasis: A global disease with regional challenges**. 2012. Disponível em: <[http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2009/03/DNDi\\_Leishmaniasis\\_factsheet.pdf](http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2009/03/DNDi_Leishmaniasis_factsheet.pdf)>. Acesso em: 14/10/15.

DOS SANTOS GARCIA, V. A. et al. Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbon dioxide to increase the concentration of l-Dopa in the defatted meal. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 69, p. 75-81, 2012.

DUARTE, I. D.; FERREIRA-ALVES, D. L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. **Life Sciences**, v. 50, n. 12, p. 891-897, 1992.

DUTRA, R. C. 2008. **Avaliação fitoquímica e farmacológica das sementes de *Pterodon pubescens* Vogel**. [Dissertação de mestrado] Juiz de Fora, MG, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008.

DUTRA, R. C., BRAGA, F.G. et al. Antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 429-435, 2009.

DUTRA, R. C. PITTELA, F. et al. Efeito cicatrizante das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em modelos de úlceras dérmicas experimentais em coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 375-382, 2009.

EMEJE M. O. et al. Nanotechnology in Drug Delivery. **Intech**, p. 69-106, 2012.

FANG, J.-Y. et al. Acoustically active perfluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: drug release and cytotoxicity against cancer cells. **Ultrasonics**, v. 49, n. 1, p. 39-46, 2009.

FAST, J. P.; MECOZZI, S. Nanoemulsions for intravenous drug delivery. In: (Ed.). **Nanotechnology in Drug Delivery**: Springer, 2009. cap. Cap 15 in nanotechnology in drug delivery, p.431-490.

FILIPPIS, F. M. D. 2001. **Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho: experimentos e modelagem.** [Dissertação de mestrado], Porto Alegre, RG, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FIOCRUZ. **As Leishmanioses.** 1997. Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm>>. Acesso em: 15/10/15.

FLORENCE, A.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.** Pharmabooks, 690p, 2011.

FONSÊCA, S. G. D. C. **Farmacotécnica de fitoterápicos.** UFC, Departamento de Fitoterápicos, 62p, 2005.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 11-19, 2012.

GALCERAN, C. B. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxy-youacapan-17 $\beta$ -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. *Inflammopharmacology*, v. 19, n. 3, p. 139-143, 2011.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 20, n. 1, p. 338-344, 2013.

GLISIC, S. et al. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO<sub>2</sub>: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, n. 1, p. 62-70, 2010.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOODMAN, L. et al. **As bases da Farmacologia Terapêutica.** McGraw-Hill, 2005.

GRAMICCIA, M. **Oxford textbook of Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control.** Oxford, 2011.

GRÉGIO, A. M. T. et al. Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. *Estudos de Biologia*, v. 28, n. 62, p. 61-66, 2006.

GRIMALDI JÚNIOR, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 77, n. 2, p. 195-215, 1982.

HABIF, T. P. **Dermatologia clínica: guia colorido para diagnóstico e tratamento.** Elsevier Brasil, 1056p, 2012.

HALDAR, A. K. et al. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular Biology International*, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HANSEN, D. Investigação antifúngica dos extratos dos frutos de *Pterodon emarginatus*. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 199-203, 1991.

HANSEN, D. et al. 14, 15-epoxygeranylgeraniol and extracts isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits: antitumor activity on glioblastoma cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 2, n. 9, p. 20, 2012.

- HANSON, J. R. **Natural products: the secondary metabolites**. Royal Society of Chemistry, 143p, 2003.
- HARRIS, D. C. **Análisis Químico Cuantitativo**. Reverté, 924p, 2009.
- HAWTHORNE, S. B. Analytical-scale supercritical fluid extraction. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 11, p. 633A-642A, 1990.
- HAYACIBARA, M. F. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1, p. 110-115, 2005.
- HOSCHEID, J. et al. Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodon pubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 272-295, 2013.
- HOSCHEID, J. et al. Development and characterization of *Pterodon pubescens* oil nanoemulsions as a possible delivery system for the treatment of rheumatoid arthritis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 484, p. 19-27, 2015.
- HOSCHEID, J. et al. Determination by GC-MS-SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: Development and validation. **Talanta**, v. 100, p. 372-376, 2012.
- HOSCHEID, J. 2016. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de estabilidade de nanoemulsões, contendo o óleo de *Pterodon pubescens*, para o tratamento de artrite reumatoide**. [Tese de doutorado] Maringá, PR, Universidade Estadual de Maringá, 2016.
- INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. 2010. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 10/1/16.
- IWU, M. M. et al. Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 436-441, 1992.
- JHINGRAN, A.; CHATTERJEE, M.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: epidemiological trends and diagnosis. **Leishmania: after the genome**. Caister Academic, Norfolk, p. 1-14, 2008.
- JONIN, T.; ADJADJ, L.; RIZVI, S. Supercritical extraction. Food Engineering. **Food Engineering**, v. 3, p. 7, 2008.
- JORGE, S. **Plantas medicinais**. Coletânea de saberes, 2009.
- KASPER, D.; FAUCI, A. **Doenças infecciosas de Harrison**. Artmed, 1168p, 2015..
- KATZ, N. et al. Atividade quimioprofilática na esquistossomose mansoni de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 183-191, 1993.
- KATZUNG, B. G. et al. **Farmacología básica y clínica**. El Manual Moderno, 1346p, 2013.
- KAYSER, F. H. **Medical microbiology**. Thieme, 725p, 2005.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KNOX, D. E. Solubilities in supercritical fluids. **Pure and applied chemistry**, v. 77, n. 3, p. 513-530, 2005.

KUO, F. **2008. Nanoemulsions for pharmaceutical and nutraceutical delivery in cancer and inflammation.** [Tese de doutorado] Lowell, Massachusetts, EUA, Universidade de Massachusetts Lowell, 2008.

LEMOS, C. O. T. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana em bactérias gram-positivas e gram-negativas de extratos de Pariparoba. **VII EPCC, Encontro Internacional de Produção Científica**, p. 5, 2011.

LESSA, M. M. et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

LI, B.; GE, Z.-Q. Nanostructured lipid carriers improve skin permeation and chemical stability of idebenone. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 276-283, 2012.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. CRC Press, 374p, 1990.

LIU, W. J. **Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies**. John Wiley & Sons, 448p, 2011.

LONGO, D. L. et al. Manual de medicina de Harrison. In: (Ed.). **Manual de medicina de Harrison**: Artmed, v.18, 1156p, 2013.

LOPES, A. **Diagnóstico e Tratamento**. Manole, 1051p, 2006.

LOPES, M. V. et al. Mitochondria superoxide anion production contributes to geranylgeraniol-induced death in *leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 9, 2012.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, v. 1, 384p, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 554p, 2008.

LUZ, P. L. D. As novas faces da medicina. In: (Ed.). **As novas faces da medicina**: Manole, 386p, 2014.

MAGILL, A. J. et al. **Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease**. Elsevier Health Sciences, 1190p, 2013.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* vog. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 520-525, 1973.

MARONI, B. C.; DI STASI, L. C.; MACHADO, S. R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado**. UNESP, 194p, 2006.

MAUL, A. Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 42-46, 1999.

MCMURRY, J. **Organic Chemistry with Biological Applications**. Cengage Learning, 1159p, 2014.

MELECCHI, M. I. S. 2005. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração.** [Tese de doutorado] Porto Alegre, RG, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MENNA-BARRETO, R. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 111-117, 2008.

MESOMO, M. C. 2013 **Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) usando CO<sub>2</sub> supercrítico e propano comprimido.** [Tese de doutorado], Curitiba, PR, Universidade Federal do Paraná, 2013.

MEZADRI, H. 2010. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos.** [Dissertação de mestrado] Ouro Preto, SP, Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.

MICHIELIN, E. M. Z. 2002. **AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO DA OLEORESINA DE CAVALINHA (*Equisetum arvense*).** [Dissertação de mestrado] Florianópolis, SC, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MIYAKE, T. **MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE EXTRATOS VEGETAIS.** UEPG, 2006. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>>. Acesso em 05/03/2015.

MNIMBS. **Antimicrobial Nanoemulsions.** 2015. Disponível em: <<http://nano.med.umich.edu/platforms/Antimicrobial-Nanoemulsion.html>>. Acesso em: 9/11/15.

MONZOTE, L. et al. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 753-758, 2014.

MORS, W. B. et al. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14, 15-epoxygeranylgeraniol. **Science**, v. 157, n. 3791, p. 950-951, 1967.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKBEL, R. M. 2005. ***Leishmania amazonensis* and macrophage interactions: immune factors necessary to kill the parasite.** [Tese de doutorado]. Ames, Iowa, Iowa State University, 2005.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica.** Elsevier Brasil, 888p, 2015.

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NETO, P. A. D. S. P.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais: do popular ao científico.** UFAL, 90 p, 2005.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana.** Atheneu, 2011.

- NGURE, P. K. et al. A review of leishmaniasis in Eastern Africa. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n. 2, p. 79-86, 2009.
- ODALO, J. O. et al. Cytotoxic, anti-proliferative and antimicrobial furanoditerpenoids from *Stuhlmanina moavi*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17, p. 2047-2052, 2009.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. **Farmacognosia**. Atheneu, 426p, 1998.
- OLIVEIRA FILHO, A. et al. Espécies de ocorrência exclusiva do domínio do cerrado. **Inventário Florestal de Minas Gerais: Espécies Arbóreas da Flora Nativa**. Lavras: UFLA, p. 157-208, 2008.
- ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.
- OSPINA, V. E. et al. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 12, n. 2, p. 195-211, 2014.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. CRC Press, 750p, 2012.
- PAPAMICHAIL, I.; LOULI, V.; MAGOULAS, K. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 18, n. 3, p. 213-226, 2000.
- PEIXOTO, A. et al. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. Editora da Universidade de São Paulo: Fapesp, 632p, 2006.
- PELLISSARI, D. M. et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.
- PENEDO, P. 2007. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico**. [Tese de doutorado] Seropédica, RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.
- PEREIRA, M. F. et al. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. **Oncology Reports**, v. 25, n. 1, p. 215-221, 2011.
- PEREIRA, T. A. 2011. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. [Dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto, SP, Universidade de São Paulo, 2011
- PICON, P. X.; MAROSTICA, P.; BARROS, E. **Pediatria: consulta rápida**. Artmed Editora, 1096p, 2010.
- PIMENTA, A. T. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 501, 2006.
- PINHEIRO, M. P. 2012. **Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major***. [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

PINTO, C. P. et al. JustinaEstudos in vitro de formulação oral de miltefosine. **IV Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica Uniban Brasil**, p. 4, 2013.

QUEIROZ, S. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RANG, H. P. et al. Farmacologia. In: (Ed.). **Farmacologia**: Elsevier, 784p, 2015.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, 2006.

REY, L. Parasitologia médica. In: (Ed.). **Parasitologia Médica**: Guanabara Koogan, 2005.

RIVITTI, E. A. **Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti**: São Paulo: Artes Médicas, 745p, 2014.

RIZVI, S. et al. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. **Food Technology (USA)**, 1986.

RIZZINI, C. T. Plantas do Brasil: árvores e madeiras uteis do Brasil manual de dendrologia brasileira. In: (Ed.). **Plantas do Brasil: árvores e madeiras uteis do Brasil manual de dendrologia brasileira**: Edgard Blucher, 1985.

ROGERS, M. E. The role of *leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 223, 2012.

ROQUE, F. et al. *In vitro* anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 3, n. 2, p. 55-61, 2015.

RUIZ, V. A.; GUILLÉN, S. M. **Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**. Ed. Médica Panamericana, 1595p, 2006..

RUZA, F. **Cuidados intensivos pediátricos**. CAPITEL EDITORES, 2269p, 2003.

SABINO, K. et al. In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 1, p. 27-35, 1999.

SALDANHA, K.; BEZERRA, M.; GUZEN, F. Utilização da nanoemulsão Lde na redução dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico. **Revista Científica da Escola da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 65-78, 2012.

SANTANDER VÁSQUEZ, S. C. **2010. Evaluación *in vitro* del efecto tóxico de una formulación de glucantime en nanoemulsión contra parásitos protozoarios del genero *leishmania*. [Monografía]**, Sangolquí, Equador, Escuela Politécnica del Ejército, 2010.

SANTOS, A. P. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-6, 2010.

SANTOS, A. O. D. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59-64, 2013.

SANTOS FILHO, D. et al. Atividade quimioprofilática de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens* na esquistossomose mansoni. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. supl. 4, p. 343-345, 1987.

SANTOS, K. A. et al. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): Supercritical CO<sub>2</sub> oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 114, p. 1-8, 2016.

SANTOS, M.; BOSS, E.; MACIEL FILHO, R. Supercritical extraction of oleaginous: parametric sensitivity analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 4-7, p. 713-720, 2000.

SANTOS, M.; NUNES, M.; MARTINS, R. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 327-334, 2012.

SANTOS, U. et al. Propriedade antibacteriana dos frutos de sucupira-branca. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**, v. 3, n. 4, p. 77-88, 2011.

SANTOS, W. R. et al. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 15, n. 9, p. 1024-1029, 1997.

SAPKALE, G. et al. Supercritical fluid Extraction - A review. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 8, n. 2, p. 729-43, 2010.

SATISH, K.; SAHOO, A. **2010 Extraction of essential oil using steam distillation. [Monografia]**. Rourkela, Índia, National Institute Of Technology Rourkela, 2010.

SCODRO, R. B. et al. A new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 18-23, 2015.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 1, p. 20-27, 1994.

SETH, S.; SETH, V. **Textbook of Pharmacology**. Elsevier, 1000p, 2009.

SHAKEEL, F. et al. Skin permeation mechanism and bioavailability enhancement of celecoxib from transdermally applied nanoemulsion. **Jornal Nanobiotechnology**, v. 6, n. 8, p. 11, 2008.

SHUKLA, A. K. et al. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, n. 8, p. 2208-2218, 2010.

SILVA, M. et al. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 135-141, 2004.

SINGHA, U. et al. Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 30, n. 4, p. 289-295, 1992.

SMITH, A. M. et al. **Plant Biology**. Garland Science, 680p, 2010.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SPINDOLA, H. M. et al. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 569-575, 2009.

SPINDOLA, H. M. et al. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxyvouacapane-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. **BMC Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

STARK, C. G.; VIDYASHANKAR, C.; CHANDRASEKAR, P. H. **Leishmaniasis. Medscape**, 2016. Disponível em: < <http://emedicine.medscape.com/article/220298-overview> >. Acesso em: 24/05/15.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed, 918p, 2013.

TAMINATO, R. L. Atividade antinociceptiva de frações obtidas da *Pterodon pubescens* Benth. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

TEIXEIRA, D. 2003. **Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng.(urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog.(Sucupira-branca) em *Aedes aegypti*. [Tese de Doutorado]** Rio de Janeiro, RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

THAKUR, A.; WALIA, M. K.; KUMAR, S. Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **Pharmacophore**, v. 4, n. 1, p. 15-25, 2013.

TOLEDO, C.E. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, 2011, p. 420–425.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiology: an introduction**. 2010.

TOURINHO, B. 2015. **Tratamento da leishmaniose visceral com anfotericina B lipossomal, [Dissertação de mestrado]**, Minas Gerais, MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

TUNDO, P. et al. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1207-1228, 2000.

VELASCO, R. J.; VILLADA, H. S.; CARRERA, J. E. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. **Información tecnológica**, v. 18, n. 1, p. 53-66, 2007.

VERMELHO, A. B. et al. Leishmaniasis: possible new strategies for treatment. **In Leishmaniasis—Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**, D. Claborn, Ed, 2014, p. 351 - 376, 2014.

VIEIRA, C. et al. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6, p. 528-532, 2008.

WHO,. **Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection** 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis\\_hiv\\_coinfection5.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf) >. Acesso em: 6/08/15.

WU, P. et al. Supercritical fluid extraction assisted isolation of sesquiterpene lactones with antiproliferative effects from *Centipeda minima*. **Phytochemistry**, v. 76, p. 133-140, 2012.

ZEIBIG, E. **Clinical Parasitology: A practical approach**. Elsevier Health Sciences, 2014.

ZHANG, H. Q. et al. **Nonthermal processing technologies for food**. John Wiley & Sons, 500p, 2011.

ZHANG, W.; CUE, B. **Green techniques for organic synthesis and medicinal chemistry**. John Wiley & Sons, 2012.

ZOONOSI, A. **Flebotomi-Phlebotominae (Sandflies)**. 2014. Disponível em: <<http://www.antropozoonosi.it/vettori/flebotomi.htm>>. Acesso em: 15/10/15.



Contents lists available at ScienceDirect

## Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

Full length article

## Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts



Éverton da Silva Santos <sup>a,\*</sup>, Francielle Pelegrin Garcia <sup>b</sup>, Priscila Miyuki Outuki <sup>a</sup>,  
Jaqueline Hoscheid <sup>a</sup>, Paulo Roberto Nunes de Goes <sup>a</sup>, Lúcio Cardozo-Filho <sup>c,d</sup>,  
Celso Vataru Nakamura <sup>a,b</sup>, Mara Lane Carvalho Cardoso <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Programme in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá, PR 87020-900, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Programme in Biological Sciences, State University of Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá, PR 87020-900, Brazil

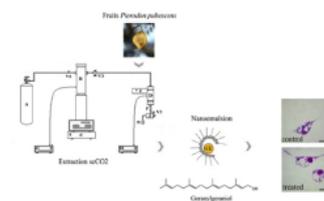
<sup>c</sup> Postgraduate Programme in Chemical Engineering, State University of Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá, PR 87020-900, Brazil

<sup>d</sup> Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, Rua General Osório, 433, São João da Boa Vista, SP 13870-431, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Extracts were prepared using a supercritical fluid method.
- Supercritical extracts were more effective against *L. amazonensis* than conventional extracts.
- *P. pubescens* nanoemulsions showed a better selectivity index against parasites.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 June 2016

Received in revised form

3 October 2016

Accepted 6 October 2016

Available online 8 October 2016

## Keywords:

*Pterodon pubescens*

Nanoemulsion

Geranylgeraniol

*Leishmania amazonensis*

Supercritical fluid extraction

## ABSTRACT

Currently, leishmaniasis is difficult to manage owing to the limited choice and high toxicity of available drugs, and emergence of drug-resistant protozoa. Medicinal plants, which produce various bioactive molecules, can help counter this global shortage. In this study, we prepared *Pterodon pubescens* fruit extracts, which show antileishmanial activity, and developed a nanoemulsion of the optimized extract to improve its performance. The extracts were prepared using conventional methods and a supercritical fluid method and were tested for activity against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. The two most effective extracts were formulated as nanoemulsions. Although both extracts showed cytotoxicity, the supercritical extracts were more effective against *L. amazonensis* promastigotes and amastigotes than conventional extracts were. This was attributed to the high content of the geranylgeraniol derivative in the supercritical extracts. The nanoemulsions showed a better selectivity index and significantly improved activity against parasites (IC<sub>50</sub>: 2.7 µg/mL for nanoemulsion of hexane extract; IC<sub>50</sub>: 1.9 µg/mL for nanoemulsion of supercritical extract) compared to the Miltefosine standard (0.7 µg/

\* Corresponding author. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Avenida Colombo, 5790 block K80. Zona Sete, 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

E-mail address: [mlanecc@yahoo.com.br](mailto:mlanecc@yahoo.com.br) (É. da Silva Santos).