



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HELENA TERU TAKAHASHI

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE EXTRATO BRUTO E DE
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.
EM *Leishmania amazonensis***

MARINGÁ

2011

HELENA TERU TAKAHASHI

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE EXTRATO BRUTO E DE
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.
EM *Leishmania amazonensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá – UEM, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2011

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fitoquímica e de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Araucária, e Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por sempre guiar meus caminhos;
- A meus pais, Antonio Takahashi e Keiko Hashimoto Takahashi, pela vida e por sempre me incentivarem para eu lutar pelos meus ideais;
- Ao professor Celso Vataru Nakamura, meu orientador, pela oportunidade, pela paciência e por sempre acreditar em mim;
- Ao professor João Carlos Palazzo de Mello, meu co-orientador, pelas orientações;
- À professora Dra. Tânia Ueda-Nakamura e professor Dr. Benedito Dias Prado Filho por me possibilitarem o uso das dependências do Laboratório de Microbiologia Aplicada ao Estudo de Produtos Naturais e Sintéticos;
- Ao funcionário do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Maringá, por cultivar a espécie *P. ruderale*, Sr. Laércio Carvalho;
- Às funcionárias do laboratório de Microbiologia: Viviane Fernandes da Silva e Marinete Martinez Vicentim pelo apoio laboratorial e pessoal;
- Ao funcionário do Laboratório de Fitoquímica Sr. Admir Arantes pelo apoio;
- Ao meu noivo Nelson Isamu Mizuta, pelo apoio, companheirismo e por sempre me incentivar na busca dos meus ideais;
- Aos meus amigos do Laboratório de Fitoquímica, especialmente, Fábio Bahls Machado, Cleyton Eduardo Mendes de Toledo, Gisely Cristiny Lopes e Fernanda Giacomini Bueno;
- Aos meus amigos e companheiros de pesquisa do laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos: Andrea Mayumi Koroishi, Eliana Harue Endo, Raíssa Bocchi Pedroso, Elizandra Aparecida Britta, Rodrigo Hinojosa Valdez, Samara Requena Nocchi, Cindy Hana Okuma, Angelo de Oliveira Caleare, Milene

Valéria Lopes, Karine Zanolí, Karin Juliane Pelizzaro Rocha, Tatiana Shioji Tiuman, Patrícia Regina Santos, Mirian Yuri Hasegawa, Marco Antonio Costa, Gislaine Franco de Moura, Solange Cardoso Martins, Francielle Pelegrin Garcia; Érika Izumi, Adriana Oliveira dos Santos Vendrame, Débora Botura Scariot, Gean Panizzon, Daniele Lazarin Bidóia, Vânia Cristina Desoti, Natielle Miranda, Renata Sespide Mazia, Jean Henrique Silva Rodrigues;

- Ao funcionário do laboratório de Farmacotécnica da UEM, Sr. Cláudio Roberto Novello, pelas orientações durante a etapa de isolamento e identificação das substâncias;
- À funcionária do Complexo Central de Apoio à Pesquisa da UEM (COMCAP), Regina Cintia Carnelós;
- À Unioeste, pela concessão de passagens rodoviárias e pelo afastamento das atividades docentes possibilitando esta oportunidade;
- Aos professores do Curso de Farmácia da Unioeste, Campus de Cascavel, especialmente, Fabiana André Falconi e Luciana de Oliveira Fariña, que me substituíram na disciplina de Controle de Qualidade Microbiológico durante meu afastamento;
- À professora Dra. Clarice Aoki Osaku, diretora do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Unioeste e professora Daniela Ferreira Miyata de Oliveira, coordenadora do curso de Farmácia, no período do meu afastamento, pelo apoio;
- Às grandes amigas Francielli de Cássia Yukari Nishimura e Maria das Graças Marciano Hirata Takizawa e Yukiko Yamaguchi, pela amizade, companheirismo e apoio;
- À funcionária da Pró-Reitoria de Pesquisa, da Divisão de Capacitação Docente da Unioeste, Sra. Sônia Lemanski, pelo apoio e incentivo;
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“É preferível variar de erros a insistir no mesmo.”

(Carlos Drummond de Andrade)

TAKAHASHI, Helena Teru. **Atividade Antileishmania de Extrato Bruto e de Substâncias Isoladas e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. em *Leishmania amazonensis***. 2011. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêutica) – Universidade Estadual de Maringá – UEM; Maringá, 2011.

RESUMO

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Esse grupo de doenças tem distribuição mundial nos cinco continentes, ocorre em 88 países e é prevalente nas regiões tropicais e subtropicais. A OMS estima que 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente. São amplamente classificadas em Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Visceral (LV). No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano. A quimioterapia para esta doença baseia-se, principalmente, nos antimoniais pentavalentes, mas também na anfotericina B e pentamidinas como fármacos de segunda escolha. O desafio ainda é grande em relação à descoberta de um fármaco ideal (de baixo custo, eficiente, de fácil administração e com baixa toxicidade) e pela sua farmacocinética, devido à natureza intracelular e localização disseminada do parasita. Portanto, há uma necessidade urgente do desenvolvimento de uma farmacoterapia adequada, sendo a pesquisa de substâncias bioativas em espécies de plantas, uma alternativa interessante, uma vez que o Brasil apresenta uma vasta biodiversidade. Dentre as plantas, destaca-se a espécie *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., empregada popularmente sobre lesões causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os objetivos deste trabalho foram: preparar o extrato bruto de partes aéreas de *P. ruderale*, fracionar e isolar substâncias; avaliar a atividade antileishmania e citotoxicidade do extrato bruto e substâncias isoladas de *P. ruderale* e verificar o efeito dessas substâncias sobre a morfologia, a ultraestrutura, e sobre a membrana mitocondrial e citoplasmática de *L. amazonensis*. O extrato bruto apresentou valores de IC_{50} de $60,3 \pm 9,2$ e $\sqrt{77,7} \pm 7,7$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sobre as formas promastigota e amastigota axênica de *L. amazonensis*. Foram isolados e identificados, através de métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrometria de massa, dois derivados tiofénicos: 5-metil-2,2':5',2''-tertiofeno (composto A) e 5'-metil-[5-(4-acetóxi-1-butinil)]-2,2'bi-tiofeno (composto B). A CC_{50} do extrato diclorometano sobre macrófagos J774G₈ foi de 500 ± 50 $\mu\text{g/mL}$. O composto A apresentou valores de IC_{50} de $7,7 \pm 1,7$; $19,0 \pm 4,7$ e 37 ± 0 $\mu\text{g/mL}$ para as formas promastigota, amastigota axênica e amastigota intracelular de *L. amazonensis*, respectivamente. A CC_{50} sobre macrófagos J774G₈ foi de 370 ± 50 $\mu\text{g/mL}$. O composto B apresentou valores de IC_{50} de $21,3 \pm 4,4$; $28,7 \pm 2,6$ e 51 ± 0 $\mu\text{g/mL}$ para as formas promastigota, amastigota axênica e amastigota intracelular de *L. amazonensis*, respectivamente. A CC_{50} sobre

macrófagos J774G₈ foi de 335±15 µg/mL. Os compostos A e B apresentaram índices hemolíticos menores do que 10%, mesmo sob uma concentração de 500 µg/mL. Células de *L. amazonensis* tratadas com os compostos A e B e marcadas com rodamina 123 indicaram despolarização na membrana mitocondrial causada pelo composto A. Por outro lado, o tratamento com os compostos A e B e a marcação com iodeto de propídio não indicaram alteração na membrana citoplasmática. O tratamento de células de *L. amazonensis* com o composto A causou alterações morfológicas quando visualizadas sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) indicou alteração ultraestrutural na mitocôndria do parasito. Células de *L. amazonensis* tratadas com o composto B indicaram alterações morfológicas pela MEV, porém, não foram evidenciadas alterações ultraestruturais pela MET. Estudos adicionais devem ser realizados para a elucidação do mecanismo de ação dos derivados tiofênicos isolados da espécie *P. ruderale*, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-chaves: Atividade antileishmania, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Derivados tiofênicos

TAKAHASHI, Helena Teru. Antileishmanial Activity of Crude Extract and Isolated Compounds from *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. in *Leishmania amazonensis*. 2011. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêutica) – Universidade Estadual de Maringá – UEM; Maringá, 2011.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus Leishmania. This group of diseases have a worldwide distribution on five continents, occurs in 88 countries and is prevalent in tropical and subtropical regions. The WHO estimates that 2 million new cases occur annually. They are classified in American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and Visceral Leishmaniasis (VL). In Brazil, the American cutaneous leishmaniasis is one of dermatological disorders that deserves more attention because of its magnitude, as well as the risk of deformities that can produce in human. The chemotherapy for this disease is mainly based on pentavalent antimonials, but amphotericin B and pentamidine can be used as second choice. The challenge is still large in relation to the discovery of an ideal drug (low cost, efficient, easy administration and low toxicity) and its pharmacokinetics, because of the widespread nature and location of the intracellular parasite. So, there is an urgent need to develop an appropriate drug therapy and the study of bioactive substances in plant species, an interesting alternative, since Brazil has a wide biodiversity. Among plants, there is the kind *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., commonly used on injuries caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The objectives of this work were to prepare the crude extract of aerial parts of *P. ruderale*, fractionate and isolate substances; to evaluate the antileishmanial activity and cytotoxicity of crude extract and isolated compounds from *P. ruderale* and to check the effect of these compounds on morphology, ultrastructure, mitochondria and cytoplasmic membrane of *L. amazonensis*. The crude extract showed IC₅₀ values of 60.3±9.2 and 77.7±7.7 µg/mL, respectively, against promastigote and axenic amastigote forms. We isolated and identified by chromatographic and spectrometric methods and mass spectroscopy, two thiophenes derivatives: 5-methyl-2, 2 ': 5', 2"-terthiophene (compound A) and 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butinil)] -2,2 'bi-thiophene (compound B). The CC₅₀ value of dichloromethane extract was 500±50 µg/mL on J774G₈ macrophages. Compound A showed IC₅₀ values of 7.7±1.7, 19.0±4.7 and 37±0 µg/ml for promastigote, axenic amastigote and intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*, respectively, and CC₅₀ value of 370±50 µg/mL on J774G₈ macrophages. The compound B showed IC₅₀ values of 21.3±4.4, 28.7±2.6 and 51±0 µg/ml for promastigotes, axenic amastigote and intracellular amastigote *L. amazonensis*, respectively, and CC₅₀ value of 335±15 µg/ml on J774G₈ macrophages. The compounds A and B showed hemolytic index lower than 10%, at a concentration of 500 µg/mL. Cells of *L. amazonensis* treated with compounds A

and B and labeled with rhodamine 123 indicated mitochondrial membrane depolarization caused by the compound A. On the other hand, treatment with compounds A and B and labeling with propidium iodide indicated no change in the cytoplasmic membrane. Treatment of cells of *L. amazonensis* with compound A caused morphological changes under a scanning electron microscope (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) indicated ultrastructural changes in mitochondria of the parasite. Cells of *L. amazonensis* treated with compound B showed morphological changes by SEM, however, there were no ultrastructural changes by TEM. Further studies should be realized to elucidate the mechanism of action of thiophenes derivatives isolated from the species *P. ruderale*, which may contribute to the development of new drugs for the treatment of leishmaniasis.

Key-words: Antileishmanial activity, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Thiophene derivatives

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 História da Leishmaniose ou Primeiros Registros da Leishmaniose	12
2.2 <i>Leishmania</i> sp.	13
2.3 Espécies de <i>Leishmania</i> sp.....	14
2.4 Características Clínicas das Leishmanioses	15
2.5 Epidemiologia no Mundo	18
2.6 Epidemiologia no Brasil	19
2.7 Diagnóstico Laboratorial	22
2.8 Diagnóstico Diferencial	23
2.9 Tratamento	25
2.10 Alvos para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Antileishmania	28
2.10.1 Via da Biossíntese de Esteróis	28
2.10.2 Metabolismo dos Folatos	29
2.10.3 Via Glicolítica	29
2.10.4 Via das Purinas	29
2.10.5 Via das Proteinases	30
2.10.6 Via das Topoisomeraseas	30
2.10.7 Via da Tripanotiona	30
2.10.8 Via do Óxido Nítrico	31
2.10.9 Cinetoplasto	31
2.11 Leishmanioses e o Uso de Plantas	31
2.11.1 <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
5 Thiophene Derivatives with Antileishmanial Activity Isolated from Aerial Parts of <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass.....	45
6 ARTIGO II: <i>Antileishmanial activity of 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene isolated from Porophyllum ruderale (Jacq.) Cass. is related to mitochondrion dysfunction in Leishmania amazonensis</i>	59
7 CONCLUSÕES	79
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	80
APÊNDICE A – Fluxograma de Extração, Isolamento e Identificação de Substâncias Antileishmania de <i>P. ruderale</i>	81
APÊNDICE B – Dados Espectroscópicos das Substâncias Isoladas ..	82

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e ocorrem em 88 países, sendo prevalente nas regiões tropicais e subtropicais (CLEM, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as leishmanioses como uma das principais doenças tropicais e estima que dois milhões de novos casos ocorram anualmente (MONZOTE et al., 2007; CLEM, 2010).

Esse grupo de doenças pode ser classificado em: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). As manifestações clínicas da doença dependem de vários fatores: espécie de *Leishmania* (fatores de virulência), área de aquisição da infecção e hospedeiro (sistema imunológico). Os sintomas variam desde lesões-cutâneas auto-limitadas, a forma mucocutânea severa até a forma visceral frequentemente fatal (HERWALDT, 1999; MALTEZOU, 2010).

No Brasil, casos de leishmaniose tegumentar são crescentes desde a década de 1980, com, em média, 28 mil novos casos por ano. No Estado do Paraná, Sul do Brasil, 3.906 casos humanos foram registrados entre 2000 e 2005 (BRASIL, 2007).

Para o diagnóstico, a conduta mais utilizada na prática é a pesquisa direta de parasitos e a intradermorreação, aliadas ao aspecto clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico (BRASIL, 2000; CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

O tratamento é feito com antimoniais pentavalentes, na dose de 10 a 20 mg/Kg/dia, durante 20 a 30 dias. As pentamidinas e a anfotericina B são empregadas como fármacos de segunda escolha. Vale ressaltar que, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas é frequente. Alguns fármacos administrados de forma tópica ou oral têm apresentado resultados satisfatórios, muito embora sejam necessários testes clínicos adicionais para se conhecer sua real eficácia (MARDEN, 1986; BRASIL, 2000; BRASIL, 2002).

Observa-se que a quimioterapia atualmente disponível é tóxica, cara e causa graves efeitos adversos. O desafio dos pesquisadores ainda é grande em relação à descoberta de um fármaco ideal (de baixo custo, eficiente, de fácil administração e com baixa toxicidade) e sua farmacocinética, devido à natureza intracelular e localização disseminada do parasita (TIUMAN et al., 2011). Além disso, a maioria das pessoas em áreas endêmicas de leishmanioses, depende da medicina tradicional e natural (MONZOTE et al., 2007).

Diante da problemática que envolve a quimioterapia das leishmanioses, o grupo de pesquisa em Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, tem realizado pesquisas para avaliação da atividade antileishmania de substâncias sintetizadas nos laboratórios do Departamento de Química (UEM) (TONIN et al., 2010) e de derivados de plantas e seus fitoconstituintes (TOLEDO et al., 2011, SANTOS et al., 2008b, BRENZAN et al., 2007; NAKAMURA et al., 2006; TIUMAN et al., 2005) o que poderão colaborar para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos para um tratamento mais adequado e eficiente das leishmanioses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História da Leishmaniose ou Primeiros Registros de Leishmaniose

Os primeiros registros iconográficos conhecidos de leishmaniose cutânea pertencem à cerâmica pré-Inca do Peru e do Equador (anos 400-900 d.C.). Neles podem observar-se faces com narizes mutilados, característicos da leishmaniose mucocutânea americana. No Velho Mundo (Ásia, África e Europa) os relatos escritos da doença datam do século I d.C. (GREVELINK; LERNER, 1996; CHOI; LERNER, 2001).

Só cerca de mil anos depois, em 1903, o agente da doença é descrito pela primeira vez e em separado por Leishman e Donovan. Era um protozoário identificado no tecido esplênico de dois doentes residentes na Índia atingidos por uma doença fatal. A doença era a LV e o seu agente, a espécie agora denominada *Leishmania donovani* (HERWALDT, 1999).

Os parasitos do gênero *Leishmania* foram independentemente descritos por Willian Leishman e Charles Donovan, em 1903, mas foram previamente observados por David D. Cunningham em 1885 e Peter Borovsky em 1989. O gênero *Leishmania* foi proposto por James Wright em 1903 (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002).

No Brasil, Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil (VIANNIA, 1912).

2.2 *Leishmania* sp.

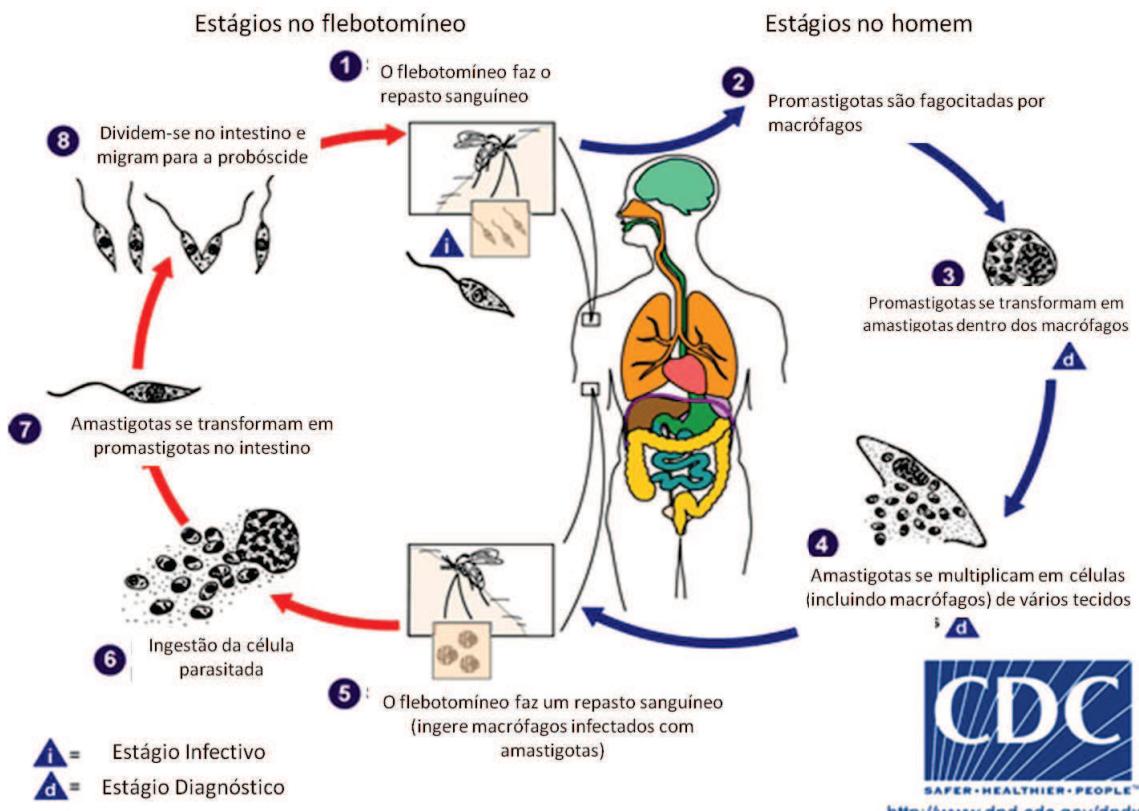
Os parasitas do gênero *Leishmania* têm um ciclo de vida heteroxênico, (Figura 1) alternando entre as formas promastigota e amastigota (SAAR; RANSFORD; WALDMAN, 1998).

As formas promastigotas são adaptadas para se reproduzirem em ambientes de baixa concentração de glicose como aqueles encontrados no intestino dos flebotomíneos. São células flageladas, infectam o inseto vetor, multiplicam-se e também infectam os vertebrados (SACKS, 1992).

As formas amastigotas são capazes de infectar os macrófagos do hospedeiro vertebrado e persistem no fagolisossomo por um longo tempo, sem serem destruídas (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). São estruturas arredondadas ou ovaladas, sem flagelos exteriorizados, parasitam o hospedeiro vertebrado em seu sistema linfomonocitário, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos onde vivem e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula. Disseminam-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos gerando um ciclo vicioso (LAINSON; SHAW, 1992; RASO; GENARO, 1994).

A alternância entre as duas fases depende, basicamente, da expressão de proteínas estágio-específicas, que são cruciais para as adaptações metabólicas frente às diferentes fontes de nutrientes, bem como para as alterações morfológicas necessárias para a sobrevivência dentro do inseto e hospedeiros vertebrados (BENTE; HARDER; WIESGIGL, 2003).

Figura 1 – Ciclo de Vida da *Leishmania* sp.



A leishmaniose é transmitida pela picada das fêmeas de flebotomíneos infectados. Os flebotomíneos injetam o parasito que está na fase infectante (ou seja, as promastigotas) de sua probóscide durante o **repasto** sanguíneo. 1) Após a picada do fletobomíneo, formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos 2) e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Formas promastigotas se transformam em amastigotas, 3) que se multiplicam por divisão binária e prosseguem infectando outras células fagocíticas mononucleares. 4) Parasita, hospedeiro, e outros fatores definem se a infecção se torna sintomática e se resultará em LTA ou LV. Flebotomíneos se tornam infectados pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo (5 e 6) Nos flebotomíneos, formas amastigotas se transformam em promastigotas e se desenvolvem no intestino (no intestino posterior para *Leishmania* do subgênero *Viannia*, no intestino médio para os do subgênero *Leishmania*), e migram para a probóscide.

Fonte: CDC, 2010a.

2.3 Espécies de *Leishmania* sp.

No Velho Mundo, as leishmanioses são causadas principalmente por *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* e são transmitidas por espécies de *Phlebotomus*, enquanto no Novo Mundo, principalmente por *Leishmania peruviana*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* e são causadas por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (ARORA; ARORA, 2007; YOUSSEF et al., 2009).

2.4 Características Clínicas das Leishmanioses

As Leishmanioses são classificadas nos tipos Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Visceral (LV). Leishmaniose Cutânea é comumente causada por *L. tropica*, *L. aethiopica*, complexo *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. peruviana* enquanto a Leishmaniose Visceral é causada por *L. donovani*, *L. infantum* que causam LV infantil e *L. chagasi* que causa a LTA (ANDREDE-NARVAEZ et al., 2005; KUMAR et al., 2008).

A leishmaniose cutânea (LC) é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Surge após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. Com a evolução, ganha destaque o notável polimorfismo das lesões sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas, enduradas e fundo com tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda em moldura (Figura 2-A). O quadro é normalmente assintomático, predominando nas áreas corpóreas descobertas e se instala em pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente. Na maioria dos casos, a infecção progride e, após um período de latência clínica de vários meses de duração, surgem as lesões cutâneas e/ou mucosas, consequentes à disseminação hematogênica e/ou linfática do parasita (FURTADO, 1994).

A Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (Figura 2-B), também denominada de espúndia, é condição de difícil tratamento e prognóstico quanto à possibilidade de cura. Está associada à *L. braziliensis*, na maioria dos casos ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não estão totalmente esclarecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização

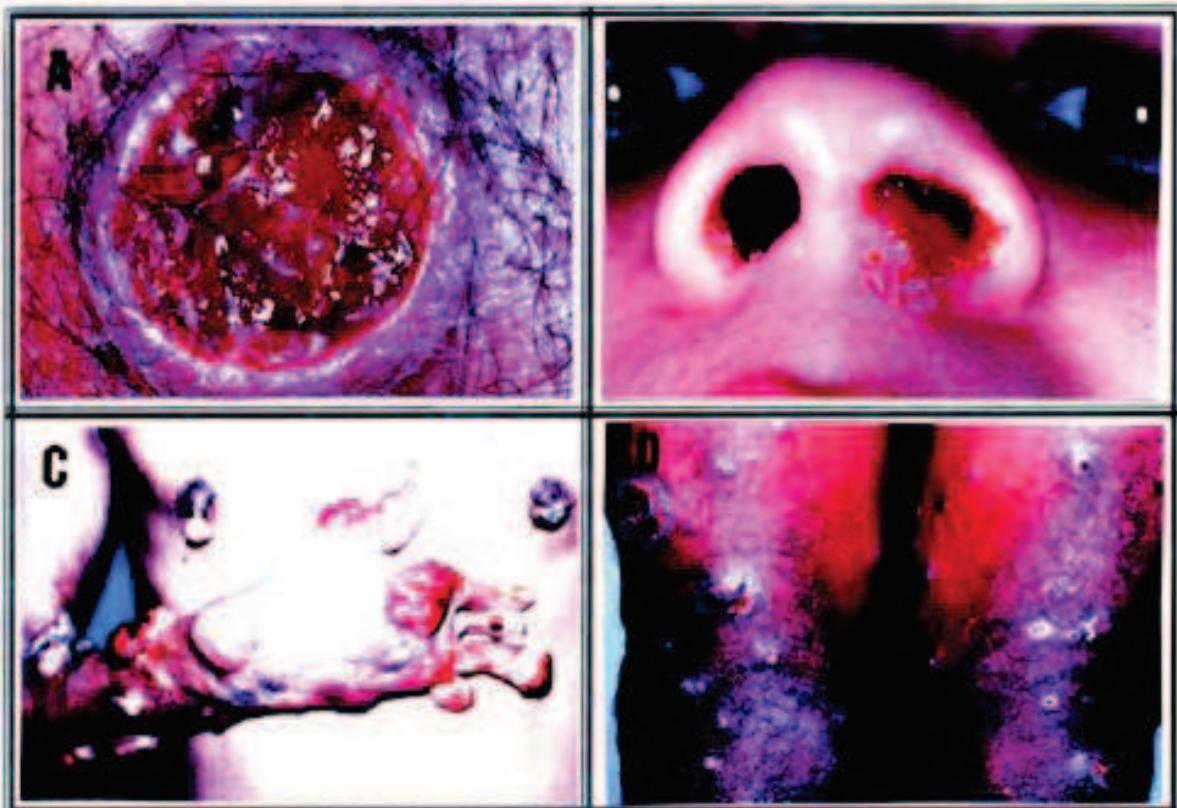
da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (MARDSEN, 1986; OMS, 1990; CARVALHO et al., 1995).

O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade ou anos após sua cicatrização. Dentre as lesões mucosas distinguem-se as seguintes variedades: forma úlcero-infiltrante, poliposa e terebrante. Na quase totalidade dos casos a LM acomete a mucosa nasal, com importante comprometimento do septo, seguindo-se, em ordem de freqüência, o envolvimento da mucosa oral. Em ambos os casos o risco de deformidades permanentes é considerável (GREVELINK; LERNER, 1996; PEARSON; SOUSA, 1996).

Entre as formas menos comuns de LTA encontra-se a Leishmaniose Cutâneo-difusa (LCD) (Figura 2-C), situada no pólo anérigo da doença, em oposição à forma polar resistente representada pela LMC e parte das leishmanioses cutâneas localizadas (LCL) (CONVIT et al., 1993). Suas lesões nodulares e infiltrações cutâneas pronunciadas simulam um quadro de hanseníase virchowiana (PEARSON; SOUZA, 1996; GREVELINK; LERNER, 1996). As lesões, via de regra, não cicatrizam espontaneamente e são classicamente resistentes ao tratamento medicamentoso (OMS, 1990; COSTA et al., 1992).

A Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD) (Figura 2-D), é caracterizada por lesões múltiplas, geralmente ulceradas, distribuídas por diversas áreas do tegumento, distantes do sítio de inoculação primária (MARZOCHI, 1992). As lesões podem ser muito numerosas (CARVALHO et al., 1994) mas respondem ao tratamento medicamentoso habitual. A forma disseminada usualmente apresenta a imunidade celular preservada, evidenciada pela positividade da intradermorreação de Montenegro.

Figura 2 – 2A: Leishmaniose Cutânea; **2B:** Leishmaniose Mucocutânea ; **2C:** Leishmaniose Cutânea Difusa; **2D:** Leishmaniose Cutânea Disseminada



Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003

LV é a forma mais grave de leishmaniose. A infecção com espécies de *Leishmania* viscerotrópicas usualmente resulta em doença assintomática ou suave, seguida por cura espontânea. Somente um a cada 30-100 casos desenvolvem LV típica. Fatores predisponentes ao desenvolvimento de LV típica incluem jovens, mal nutridos, pobreza, imunodeficiência e alta carga parasitária (MALTEZOU, 2010).

A progressão para LV típica geralmente leva 2 a 8 meses ou ocasionalmente mais tempo, entretanto, casos de infecção após 2 semanas tem sido reportados (MALTEZOU, 2010). Tipicamente, o paciente desenvolve febre, fraqueza, anorexia, perda de peso, palidez, hepatoesplenomegalia (geralmente com predominância de esplenomegalia), linfoadenopatia e deterioração progressiva (KAFETZIS; MALTEZOU, 2002) (Figura 3). Em geral, pacientes quase sempre apresentam febre, hepatoesplenomegalia e trombocitopenia (MALTEZOU et al., 2000).

Figura 3 - Leishmaniose Visceral: Hepatoesplenomegalia



Fonte: EVANS, REIS, ALENCAR, 1985.

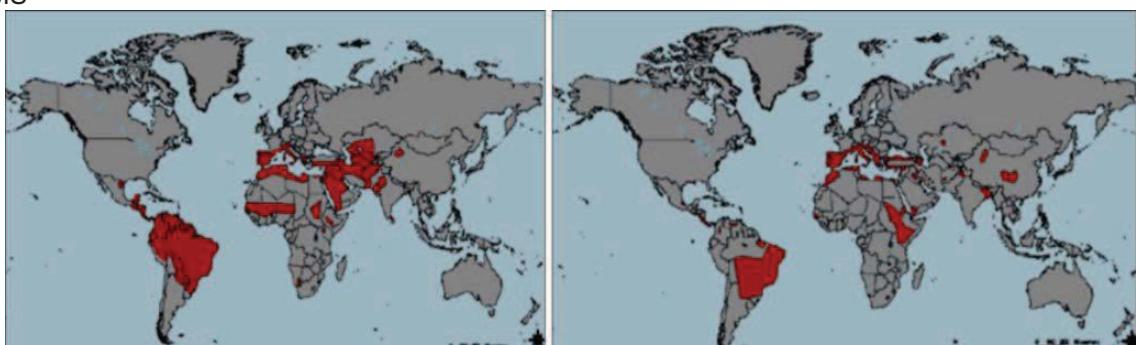
Crianças também podem apresentar crescimento retardado. Achados tardios incluem epistaxe, hemorragia gengival, distensão abdominal, edema e ascite. Achados laboratoriais incluem anemia normocítica e normocrômica, neutropenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e aumento das transaminases hepáticas (MALTEZOU et al., 2000). Ocasionalmente, a LV pode se manifestar como hepatite aguda, colecistite, síndrome hemofagocítica e Síndrome de *Guillain-Barré* (KAFETZIS; MALTEZOU, 2002). Se não tratada, a LV é quase sempre fatal. A morte é causada por hemorragia, anemia severa ou infecção secundária (MALTEZOU, 2010).

2.5 Epidemiologia no Mundo

No geral, as leishmanioses são encontradas em regiões específicas de 88 países. Alguns destes países são responsáveis pela maior parte dos casos mundiais: mais de 90% dos casos de LC ocorrem em regiões do Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita e Síria (no Velho Mundo), no Brasil e Peru (no Novo Mundo); mais de 90% dos casos de LV ocorrem em regiões da Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. O número de novos casos de LC e o de LV a cada ano está em torno de 1,5 milhão e 500.000, respectivamente (CDC, 2010b).

A distribuição geográfica da leishmaniose é limitada às áreas de distribuição natural do mosquito, o vetor de doença. O desenvolvimento econômico, a urbanização generalizada, o desmatamento e desenvolvimento de novos assentamentos, além da migração das zonas rurais para as urbanas, são responsáveis pela propagação do mosquito (WHO, 1998).

Figura 4 - Distribuição da Leishmaniose Cutânea no Novo e Velho Mundo (esquerda) e Visceral no Novo e Velho Mundo (direita). As áreas afetadas estão marcadas em vermelho de acordo com a OMS



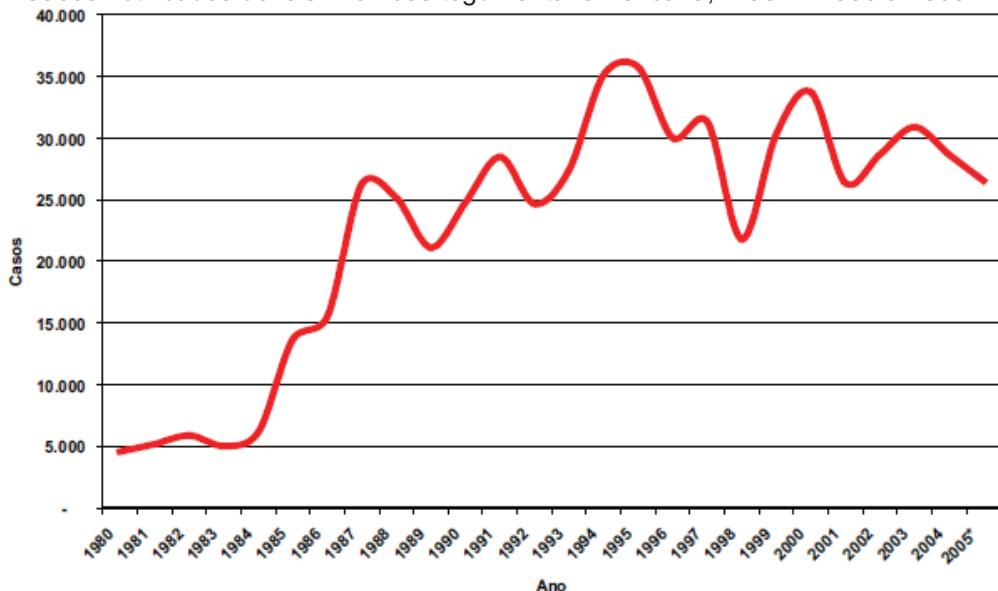
Fonte: SANTOS et al., 2008a.

2.6 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2007).

Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. A partir da década de 80, verifica-se aumento do número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Observam-se picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos, a partir do ano de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da LTA no país (BRASIL, 2007) (Figura 5).

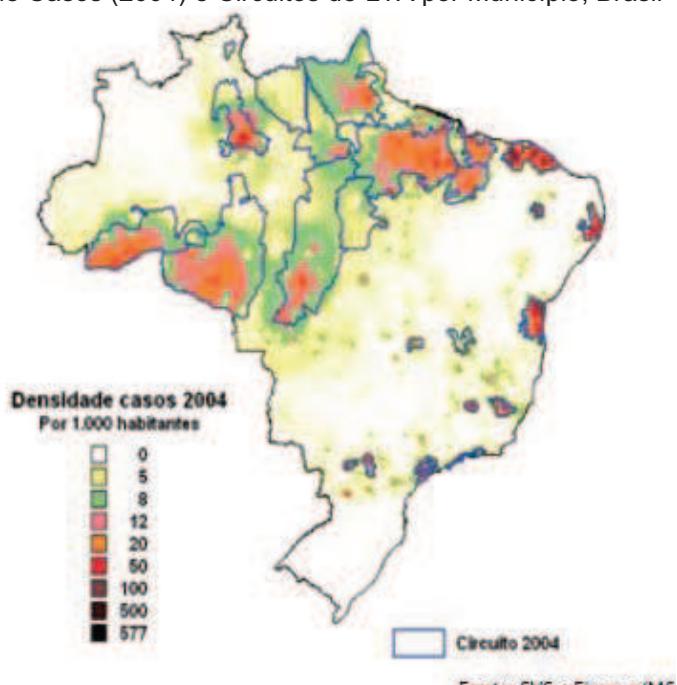
Figura 5 - Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2005.



Fonte: BRASIL, 2007

Considerando o indicador da densidade de casos de LTA (número de casos de LTA por Km²), identificou-se no período de 2001 a 2003, 24 circuitos de produção da doença de importância epidemiológica no Brasil (Figura 6 e Tabela 1), o que representa 75% (21.537) do total de casos registrados em 2004 (28.569) (BRASIL, 2007).

Figura 6 - Densidade de Casos (2004) e Circuitos de LTA por Município, Brasil – 2001 a 2003.



Fonte: SVS e Fiocruz/MS

Fonte: BRASIL, 2007

No Estado do Paraná, Sul do Brasil, 3.906 casos humanos foram registrados entre os anos de 2000 e 2005. A transmissão autóctone é encontrada em três regiões: no Vale da Ribeira, onde a doença foi registrada por mais de um século, com 49 casos humanos de 2000 a 2005; na região Central, onde a leishmaniose tem sido reportada somente desde 2002, com 116 casos, e na região Norte do Estado, onde houve um surto de LC em 1994 (BRASIL, 2007).

Tabela 1 - Indicadores Epidemiológicos de 2004 nos Circuitos de Produção de Leishmaniose Tegumentar Americana (2001 – 2003), Brasil

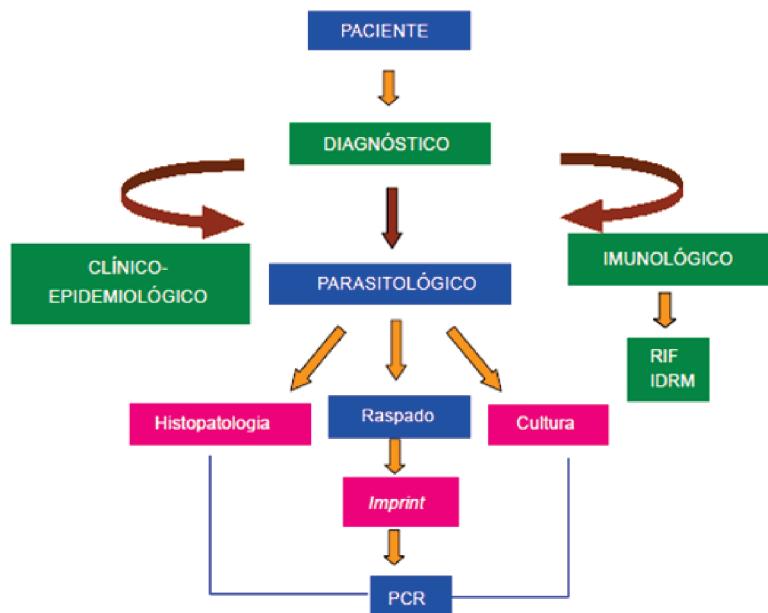
CIRCUITO	TX. Detecção	Dens. Casos	% casos masc	% casos < 10 anos	% f. mucosa	% diag. Clínico	% abandono
1 (MA)	45,39	370,32	27,20	5,68	3,59	7,03	0,75
2 (MA)	162,35	301,42	23,35	1,72	1,72	5,55	0,92
3 (PA)	197,54	25,28	85,34	5,21	4,89	14,33	2,93
4 (PA/TO/MA)	295,03	551,84	19,52	1,68	0,48	3,12	0,88
5 (MG)	135,0	181,32	55,99	13,92	7,12	12,72	4,21
6 (MG)	3,17	304,75	65,49	9,86	4,93	11,97	0,70
7 (MG/ES)	0,03	236,04	59,06	13,77	9,78	15,58	3,62
8 (RJ/SP)	2,64	395,74	57,94	13,10	9,13	17,06	4,76
9 (SP)	1,13	165,02	10,87	9,78	9,78	19,57	2,17
10 (PR)	9,29	240,45	64,79	14,08	5,63	14,08	0,00
11 (PR)	26,95	187,83	81,88	8,05	10,07	16,11	0,67
12 (RO/AC/AM)	831,40	83,14	67,83	22,55	5,94	11,64	3,00
13 (AM/RR)	98,72	177,53	72,74	18,00	6,34	13,29	3,25
14 (PA/AP)	196,23	62,24	79,44	12,32	5,59	14,97	3,87
15 (PA)	179,69	17,97	78,37	15,38	5,29	14,42	3,37
16 (PA)	188,71	86,03	80,24	8,78	5,79	12,08	3,49
17 (RO/AM/MT)	217,70	64,92	88,31	4,28	3,72	12,14	3,58
18 (RR)	27,25	109,02	87,10	8,06	6,45	11,29	1,61
19 (PA/MT)	293,10	49,10	89,86	2,88	6,51	16,33	4,38
20 (DF/GO)	2,74	245,44	71,43	9,52	1,59	11,11	3,17
21 (CE/PI)	35,31	341,02	54,37	14,88	6,31	16,21	2,8
22 (CE/PE)	38,88	381,12	49,76	16,10	9,27	17,56	1,46
23 (PB/PE/AL)	32,27	408,19	62,11	22,63	5,79	16,84	3,68
24 (BA)	64,77	323,76	60,79	13,43	5,52	14,91	2,97

Fonte: BRASIL, 2007

2.7 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa de parasitos em esfregaço de lesões após a coloração por Giemsa. Utiliza-se para a coleta do material a escarificação do bordo da lesão, biópsia do bordo com impressão por aposição em lâmina de vidro e/ou punção aspirativa da lesão. Pode-se realizar o diagnóstico de forma indireta, pela mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasita (intradermorreação de Montenegro), que deve ser medida entre 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de enduração maior do que 5 mm. Em laboratórios de maior complexidade, podem ser realizados outros exames, tais como o histopatológico (coloração pela hematoxilina-eosina e uso de anticorpos marcados com imunoperoxidase para detecção do parasito), cultivo *in vitro* (empregando-se meio NNN bifásico), *in vivo* (empregando-se hamster), sorologia (através da imunofluorescência, ELISA e aglutinação direta) e PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; SINGH; SIVAKUMAR, 2003) com resultados em geral satisfatórios (FABER et al., 2003; VEGA-LOPES, 2003). Na prática, a conduta mais utilizada é a pesquisa direta de parasitos e a intradermorreação (BRASIL, 2000; CAMARGO; BARCINSKI, 2003) aliadas ao aspecto clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico (Figura 7; Tabela 2).

Figura 7 – Aspectos a serem considerados para o Diagnóstico das Leishmanioses



Fonte: GONTIJO; CARVALHO, 2003.

Tabela 2 – Métodos para o Diagnóstico Laboratorial das Leishmanioses

Métodos	Características
Exame Histológico Raspagem, biópsia ou aspirado	Método comumente mais utilizado e mais fácil; demonstração de amastigotas no esfregaço ou amostra de biópsia ou promastigotas no aspirado
Cultura Em meios Scheneider, Drosophila ou NNN	Não-confiáveis, os micro-organismos são difíceis de serem isolados especialmente se as lesões são antigas; resultados podem levar de 1 a 3 semanas, dependendo da carga parasitária
Técnicas Moleculares PCR Detecção de Antígeno (uso de anticorpos monoclonais) Hibridização de DNA (para detecção de genoma)	Permite a identificação das espécies; útil no acompanhamento de pacientes após o tratamento; não estão amplamente disponíveis em regiões endêmicas; caro; não empregado na prática; ainda somente como ferramenta na pesquisa Depende do tipo de resposta de hipersensibilidade tardia após a injeção intradérmica de promastigotas mortas; pode produzir resultados positivos em 3 meses após o aparecimento de lesões; resultado é considerado positivo se enduração de 5mm se desenvolve após 48 h. Notas importantes: não detecta infecção aguda; reação não pode ser realizada em imunocomprometidos quase 70% da população em áreas endêmicas resultarão em teste positivo; não aprovados para uso nos Estados Unidos.
Reação de Montenegro	
Testes Sorológicos ELISA, IFA, DAT, Strip Tests	A detecção de anticorpos do soro pode ser útil no diagnóstico da leishmaniose visceral, mas não para a cutânea.

Nota: DAT: *Direct Agglutination Tests*; ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; IFA: *Indirect Immunofluorescence*; NNN, *Novy-MacNeal-Nicolle*; PCR, *Polymerase Chain Reaction*

Fonte: MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010.

2.8 Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial da leishmaniose varia de acordo com a forma clínica e a área de aquisição da infecção. A LV deve ser suspeitada em pessoas que relataram viagem a uma área endêmica e uma inexplicável doença febril, especialmente quando hepatoesplenomegalia e trombocitopenia estão presentes. Devido ao longo período de incubação das leishmanioses, é fundamental para os médicos considerar relatos de viagens para áreas endêmicas ocorridas há vários meses ou anos. Fatores de risco para a infecção HIV devem ser considerados, incluindo contatos sexuais, uso de drogas por via intravenosa e transfusões de sangue obtidas no exterior (MARKLE; MARKHOUL, 2004).

O exame microscópico de esfregaços de aspirados de medula óssea é o método de referência para o diagnóstico da LV, e a sensibilidade deste método é maior do que 90% em crianças e cerca de 70% em adultos. A taxa de sensibilidade é aumentada (> 95%) quando são empregados aspirados do baço; entretanto, num contexto de profunda trombocitopenia, a amostragem de baço pode provocar risco de vida por hemorragia (KAFETZIS; MALTEZOU, 2002; BOELAERT et al., 2007).

O diagnóstico também pode ser confirmado com métodos moleculares utilizando diferentes espécimes clínicos (sangue periférico, medula óssea, baço), com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade (BOELAERT et al., 2007; VAN DER MEIDE et al., 2008). Os testes sorológicos (Teste de Aglutinação Direta, Enzimaimunoensaio e Imunofluorescência Indireta) são empregados quando outros métodos não estão disponíveis, com alta sensibilidade e especificidade. Os valores de *cut-offs* podem depender da área e das taxas de prevalência de infecções assintomáticas (MALTEZOU, 2010). Como regra, anticorpos IgG permanecem detectáveis por vários anos após o tratamento adequado. Portanto, testes sorológicos não devem ser usados para casos de recidivas (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é útil para o diagnóstico da LC e LM devido à baixa carga parasitária. PCR é o método mais comum disponível atualmente para o diagnóstico espécie-específico das leishmanioses, o que é fundamental para a escolha do tratamento adequado (MALTEZOU, 2010). A LC deve ser diferenciada das úlceras traumáticas, de estase, por diabetes, por anemia falciforme, das piodermites, da paracoccidioidomicose, da esporotricose, cromoblastomicose, das neoplasias cutâneas, da sífilis e da tuberculose. A LCD deve ser diferenciada da hanseníase virchowiana.

A LM deve ser diferenciada das seguintes patologias: paracoccidioidomicose, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, sarcoidose, bouba, sífilis terciária, granuloma médio facial e neoplasias (BRASIL, 1994; BRASIL, 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003). As leishmanioses devem ser diferenciadas de outras doenças que podem apresentar sinais e sintomas semelhantes (Tabela 3).

Tabela 3 – Doenças das quais as Leishmanioses devem ser Diferenciadas

Leishmaniose Visceral	Leishmaniose Cutânea e Mucosa
Febre Tifóide	Tuberculose
Brucelose	Infecção Bacteriana não-tuberculosa
Endocardite Bacteriana Subaguda	Hanseníase
Tuberculose Miliar	Sífilis
Mononucleose Infecciosa	Bouba
Malária	Actinomicose
Síndrome Esplenomegálica Tropical	Micoses (blastomicoses, coccidioidomicose, histoplasmose)
Histoplasmose	Infecção bacteriana
Esquistossomose	Infecção após picada de inseto
Tripanossomíases	Sarcoidose
Leucemia	Câncer de pele
Linfoma	Pólipo Nasal
Má nutrição	Desvio de Septo

Fonte: PAVLI; MALTEZOU, 2010

2.9 Tratamento

Um agente antileishmania ideal deveria ser eficaz, seguro, de fácil administração e de preço acessível. Na prática, no entanto, este agente não está disponível (PAVLI; MALTEZOU, 2010). A Tabela 4 contém os fármacos que são empregados no tratamento convencional das leishmanioses.

O fármaco de primeira escolha é o antimonal pentavalente, que foi padronizado pela OMS na dose entre 10 a 20 mg/Sb⁺⁵/Kg/dia (Sb⁺⁵ significando antimônio pentavalente), por 20 a 30 dias (BASANO; CAMARGO, 2004).

Tabela 4 - Fármacos que são empregados no tratamento convencional das leishmanioses

Nome Comercial	Nome Químico	Estrutura 2-D	Fórmula Química	Massa Molar (g/mL)
Pentostan®	Estibogluconato de Sódio		C ₁₂ H ₃₈ Na ₃ O ₂₆ Sb ₂	910,9
Fungizona	Anfotericina B		C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇	924,084
Humatina	Sulfato de Paromomicina		C ₂₃ H ₄₇ N ₅ O ₁₈ S	615,629
Pentamidina	Isonionato de Pentamidina		C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂	340,42
Glucantime	Antimoníato de Meglumina		C ₁₄ H ₂₉ O ₁₀ N ₂ Sb	507,01

Fonte: SANTOS et al., 2008a

A experiência com antimoniais por quase 70 anos indica uma taxa de eficácia maior do que 90-95% e baixas taxas de mortalidade e recidivas no paciente (MINODIER et al., 1998; MALTEZOU et al., 2000; RITMEIJER et al., 2006). Uma vantagem é seu baixo custo; as principais desvantagens incluem a administração

por via intramuscular por períodos prolongados (20 mg/kg por 21 a 30 dias), e efeitos adversos, tais como: arritmias cardíacas, aumento das transaminases hepáticas séricas, pancreatite e pneumonites (MALTEZOU et al., 2000; MALTEZOU, 2008).

A anfotericina B tem uma excelente atividade antileishmania, com taxas de cura maiores do que 90% na Índia empregando-se uma dose de 0,75 mg/kg por 15 dias para LV (SUNDAR et al., 2007). As recidivas são raras, exceto entre pacientes HIV positivos. Devido à administração, hospitalização prolongada e frequentes efeitos adversos (nefrotoxicidade, hipocalêmia, febre e calafrios), o tratamento convencional empregando anfotericina B não oferece vantagens sobre os antimoniais pentavalentes (MALTEZOU, 2008). Entretanto, formulações lipídicas de anfotericina B (anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B, e anfotericina B dispersa em colesterol) agem seletivamente no sistema reticulo-endoacial do hospedeiro (onde os parasitas se replicam) oferecendo a vantagem de aumentar a eficácia no local com uma toxicidade sistêmica limitada (MALTEZOU, 2010).

A pentamidina, uma diamina aromática, pode ser usada como alternativa aos antimoniais e devido à longa experiência em relação à eficácia e segurança, é considerada o agente de primeira escolha para *L. guyanensis* na Guiana Francesa, Suriname e Brasil. A pentamidina é administrada numa dose de 300 mg uma vez por semana durante 3 a 5 semanas (BLUM; HATZ, 2009). A elevação da enzima creatinina kinase tem sido relatada quando são empregadas doses muito elevadas, portanto, a creatinina kinase e a função renal devem ser avaliadas antes de cada aplicação (BLUM; HATZ, 2009).

A miltefosina é o primeiro fármaco antileishmania oral. É considerada teratogênica. Estudos preliminares indicaram resultados promissores com o uso da miltefosina para LC e LM no Novo Mundo, numa dose de 2,5 mg/Kg/dia durante 28 dias. Os efeitos adversos mais frequentes são: náuseas, vômitos, enjôos, dores de cabeça e diarréias. A elevação dos níveis de creatina kinase e transaminases também tem sido reportada (SUNDAR et al., 2007; BLUM; HATZ, 2009).

Os imidazóis e triazóis relacionados estruturalmente (fluconazol, itraconazol e cetoconazol) também indicaram atividade antileishmania. Eles podem ser administrados oralmente e tem um bom perfil de segurança, entretanto, são efetivos contra um número limitado de espécies de *Leishmania* (BLUM; HATZ, 2009).

Atualmente, a anfotericina B lipossomal é o fármaco de escolha para a LV na Europa e Estados Unidos e em outros países industrializados pelo efeito rápido e taxas de cura próximas a 100%, num tratamento de 3 a 5 dias e custo reduzido (OLLIARO et al., 2005).

As leishmanioses, por mais de um século tem sido tratadas principalmente com os antimoniais pentavalentes. É um grupo de doenças que representa um problema significativo a nível mundial. O desafio ainda é grande em relação à descoberta de um fármaco ideal (de baixo custo, eficiente, de fácil administração e com baixa toxicidade) e sua farmacocinética, devido à natureza intracelular e localização disseminada do parasito. O potencial de alguns transportadores coloidais de fármacos, tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas são de grande interesse, principalmente por serem versáteis e por apresentarem vantagens atrativas no contexto das doenças parasitárias. A moderna tecnologia envolvendo novos sistemas de transporte de fármacos deveria ser empregada pelas indústrias farmacêuticas, o que poderia acarretar em melhor uso das plantas e seus extratos, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos e semi-sintéticos (TIUMAN et al., 2011).

2.10 Alvos para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Antileishmania

O desenvolvimento de novos fármacos antileishmania através da identificação de diferenças metabólicas e bioquímicas existentes entre o hospedeiro vertebrado e o parasito podem ser explorados como possíveis alvos. (SHUNKLA et al., 2010). Alguns dos principais alvos são:

2.10.1 Via da Biossíntese de Esteróis

Os esteróis são componentes importantes da membrana celular que são vitais para a função celular e manutenção da estrutura celular. Ao contrário das células de mamíferos, que têm colesterol como os principais esteróis da membrana, os tripanossomatídeos sintetizam ergosterol e outros 24-metil esteróis, que são necessários para o seu crescimento e viabilidade. Estes esteróis estão ausentes nas

células dos mamíferos. Portanto, a via de biossíntese de esteróis da *Leishmania* é considerada um importante alvo (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

2.10.2 Metabolismo dos Folatos

A via dos folatos tem como alvo principal a enzima diidrofolato redutase (DHFR), que faz a redução do ácido diidrofólico a ácido tetraidrofólico, usando NADPH com cofator. Muitos pesquisadores trabalham em busca de compostos que atuem inibindo a (DHFR), prejudicando, assim, esta via metabólica (BECK; ULLMAN, 1991)

2.10.3 Via Glicolítica

O metabolismo energético de tripanossomatídeos depende das fontes de carbono disponíveis no hospedeiro vertebrado. A glicólise é a única fonte de geração de adenosina trifosfato (ATP) (OPPERDOES, 1987). Sete das enzimas glicolíticas são compartimentalizadas nos peroxissomas e glicossomas, que são características exclusivas de tripanossomatídeos. A compartimentalização de enzimas glicolíticas nos glicossomas em *Leishmania* e sua grande distância filogenética dos hospedeiros vertebrados conferem às espécies de *Leishmania* características peculiares. Estes recursos podem ser explorados através do desenvolvimento de inibidores específicos na base da estrutura das enzimas parasitárias (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

2.10.4 Via das Purinas

Aos protozoários, inclusive nas do gênero *Leishmania*, faltam enzimas para sintetizar nucleotídeos púricos, portanto, eles dependem de um sistema de captação de purinas dos hospedeiros vertebrados. As bases púricas são translocadas através da superfície da célula do parasito através de transportadores (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

Dois transportadores específicos que têm sido bem documentados de *Leishmania* são LdNT1 (presente nas formas promastigotas e amastigotas) e LdNT2 (presente em amastigotas) (VASUDEVAN et al 1998; CARTER et al 2000). LdNT1 é responsável pelo transporte de adenosina e nucleosídeos pirimidínicos, LdNT2 transporta nucleosídeos púricos (inosina e guanosina) (VASUDEVAN; ULLMAN; LANDFEAR, 2001).

2.10.5 Via das Proteinases

As proteinases são classificadas em quatro tipos principais: cisteína, serina e aspartato-proteinases e as metalo-enzimas. O nome da enzima é dado de acordo com o resíduo presente no sítio ativo. Nos protozoários, a proteinases mais caracterizadas são as cisteína-proteinases que são homólogas às catepsinas dos mamíferos. As cisteína-proteinases têm atraído a atenção como potenciais alvos de fármacos devido ao seu papel na interação parasito-hospedeiro, como fator de virulência e por serem estruturalmente diferentes dos mamíferos (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

2.10.6 Via das Topoisomerase

As topoisomerases são enzimas que exercem função em muitos processos essenciais tais como na replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA. São amplamente classificadas como topoisomerases do tipo I e II que quebram a fita simples e dupla do DNA, respectivamente (DAS et al., 2004).

2.10.7 Via da Tripanotiona

A tripanotiona é uma molécula chave contra o estresse oxidativo em espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*. É crucial para a manutenção do potencial redox e, portanto, essencial para a sobrevivência do parasito. A síntese da tripanotiona é catalizada por duas enzimas: tripanotiona sintetase (TS) e tripanotiona redutase

(TR). A TS catalisa a síntese de duas moléculas de glutationa e espermidina. A tripanotiona é então mantida na forma reduzida pela enzima TR na presença de NADPH (FAIRLAMB et al., 1985). Nos mamíferos, a manutenção deste potencial redox é realizada pela via glutationa/glutationa redutase. Esta diferença é alvo de estudo de novos fármacos inibidores desta via metabólica (CASTRO-PINTO et al., 2004).

2.10.8 Via do Óxido Nítrico

Dentre as vias potenciais estudadas para a ação de fármacos antileishmania, existe a via do óxido nítrico. Com a verificação da produção de óxido nítrico por *L. amazonensis*, testes vêm sendo realizados à procura de fármacos, que atuem inibindo essa produção. Os dados indicam a existência de verdadeiro *cross-talk* envolvendo a óxido nítrico sintase (NOS) para que o parasita se proteja do ambiente hostil do macrófago (GENESTRA et al., 2003).

2.10.9 Cinetoplasto

Os tripanossomatídeos apresentam uma característica não-usual, um DNA mitocondrial organizado em mini e maxicírculos, conhecido como DNA do cinetoplasto (kDNA). A replicação do kDNA é um processo complexo que envolve muitas proteínas. Algumas delas são classificadas como topoisomerases e exercem papel biológico essencial, não somente na síntese do kDNA, mas também na dinâmica da formação da rede do kDNA, constituindo o principal alvo para fármacos que atuam no cinetoplasto (MOTTA, 2008).

2.11 Leishmanioses e o Uso de Plantas

A OMS classificou as leishmanioses como umas das principais doenças tropicais. A terapia disponível atualmente é tóxica, cara e causa vários efeitos adversos (MONZOTE et al., 2007).

São consideradas doenças negligenciadas. Doenças negligenciadas são aquelas que não só prevalecem em condições de baixas condições sócio-econômicas, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. Segundo dados da OMS, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial. Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2010).

Devido à limitada disponibilidade de medicamentos eficazes, a maioria das pessoas em áreas onde a doença é endêmica depende em grande parte dos tratamentos da medicina tradicional e popular para aliviar os sintomas (CHAN; PEÑA, 2001; MONZOTE et al., 2007).

Os produtos naturais são potenciais fontes de ampla variedade de substâncias bioativas com uma notável diversidade e acessibilidade na natureza. Recentemente, o Programa de Doenças Tropicais da OMS, com o Programa de Pesquisa de Novos Fármacos, considerou como prioridade a pesquisa farmacológica envolvendo plantas (CHAN; PEÑA, 2001). Amplos estudos da atividade de produtos naturais antileishmania durante os últimos anos foram realizadas. Recentemente, os maiores avanços neste campo têm sido revisados por Polonio e Efferth (2008), Monzote (2009), Tiuman et al. (2011) que listaram plantas e produtos derivados de plantas que apresentaram atividade antileishmania (Tabela 5).

Tabela 5 – Produtos Naturais que apresentaram Atividade Antileishmania

Composto	Fonte Natural	Atividade Antileishmania	Referência
2',6'-dihidroxi-4'-metilchalcona	<i>Piper aducum</i>	Atividade <i>in vitro</i> contra promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	Caio et al., 1999
Alcalóide 6-cantinona	<i>Zanthoxylum chiloperone</i>	Atividade <i>in vitro</i> em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	Ferreira et al., 2002
Coronaridina	<i>Peschiera australis</i>	Atividade <i>in vitro</i> contra promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	Delorenzi et al., 2001
Lincochalcona A	<i>Chinese licorice</i>	Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>L. major</i> e <i>L. donovani</i>	Chen et al., 1993
Mesabalídeo III	<i>Maesa balansae</i>	Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>L. donovani</i>	Maes et al., 2004
Partenolídeo	<i>Tanacetum parthenium</i>	Atividade contra promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	Tiuman et al., 2005
Plumbagina	<i>Pera benensis</i>	Atividade <i>in vitro</i> em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. venezuelensis</i>	Fournet et al., 1992
Tricotecenos	<i>Holarrhena floribunda</i>	Atividade antileishmania contra promastigotas e amastigotas de <i>L. donovani</i>	Loukaci et al., 2000

Fonte: MONZOTE, 2009.

Na busca permanente de melhores fármacos antileishmania, a pesquisa de produtos derivados de plantas está crescendo por serem facilmente disponíveis e relativamente de baixo custo. O isolamento e a purificação de princípios ativos de plantas medicinais foi um dos principais fatores que levaram ao nascimento da indústria farmacêutica no século 19. Atualmente, tem ocorrido um maior interesse na pesquisa dos "produtos naturais" para busca de inibidores de enzimas essenciais para a replicação, reguladores do ciclo celular ou inibidores de fatores de virulência de micro-organismos. Existem aproximadamente 380.000 espécies de plantas em todo o mundo, das quais apenas uma parcela até agora tem sido estudadas e que mostraram potenciais propriedades quimioterápicas (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003; SALEM; WERBOVETZ, 2006). Portanto, ainda há muito a ser explorado para identificar plantas como fontes de fármacos, especialmente na forma de metabólitos ou fitoconstituintes com potencial atividade antileishmania.

2.11.1 *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.

Dentre as plantas popularmente utilizadas como tratamento alternativo das lesões da LTA, cita-se a espécie *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., conhecida popularmente como cravinho, couve cravinho, erva-fresca, erva-de-veado, arnica-brasileira, arnica-do-campo, arruda-de-galinha, cravo-de-urubu e picão-branco (FONSECA; MEIRA; CASALI, 2006).

P. ruderale faz parte da família Asteraceae. A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (HEYWOOD, 1993). Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de *habitats*, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (JOLY, 1979).

P. ruderale é considerada uma planta anual, herbácea, de caule ereto, glabra, com 60 cm a 120 cm de altura, apresentando cavidades secretoras (MILAN, HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). É nativa do Brasil, propaga-se apenas por sementes. É considerada invasora por adaptar-se a diversos tipos de solo, inclusive pobres e arenosos, sendo sua frequência mais expressiva na região Sudeste do País (KISSMAM, GROTH, 1997) (Figura 8).

A espécie é quimicamente constituída por saponinas (LIMA-NETO et al., 1996), óleos essenciais, flavonóides, taninos e alcalóides (SILVA; AKISUE; AKISUE, 1996; GUILLET; BÉLANGER; ARNASON, 1998), compostos fenólicos e lipídicos (WAGNER; SUTER; MERFORT, 2004), e derivados tiofénicos (TAKAHASHI et al., 2011).

P. ruderale é utilizada popularmente como cicatrizante e anti-inflamatória (SILVA; ARAÚJO; AKISUE, 1996), antifúngica, antibacteriana, leishmanicida, no controle da hipertensão arterial, em picadas de ofídios e no tratamento de doenças reumáticas (MARQUESINI, 1995).

Figura 8 – Foto da Espécie *P. ruderale* (Jacq.) Cass.



Fonte: Helena Teru Takahashi

As espécies do gênero *Porophyllum* são amplamente utilizadas na medicina popular das Américas do Sul e Central (FONSECA; CASALI; BARBOSA, 2007). No entanto, ainda há poucos estudos farmacológicos envolvendo esta espécie. Alguns relatos da literatura relacionam-se à atividade antileishmania de extrato hidroalcoólico de *P. ruderale* (JORGE et al., 1998), atividade antibacteriana e inseticida de óleos essenciais (GUILLET; BÉLANGER; ARNASON, 1998; RONDÓN et al., 2008), atividade fotoprotetora de extrato bruto (ROSA et al., 2008), atividade anti-inflamatória e analgésica de extrato aquoso (LIMA et al, 2011) e atividade antileishmania de compostos tiofénicos (TAKAHASHI et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi, por meio de um estudo bioguiado, isolar substâncias com atividade antileishmania de partes aéreas de *P. ruderale* em *L. amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Os objetivos específicos deste trabalho foram:
- Preparar o extrato bruto de partes aéreas de *P. ruderale* e, através de métodos cromatográficos, isolar substâncias com atividade antileishmania do extrato bruto;
 - Avaliar a atividade do extrato bruto, frações e substâncias isoladas de *P. ruderale* sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
 - Determinar a estrutura das substâncias isoladas, por métodos espectroscópicos e espectrometria de massas;
 - Avaliar a citotoxicidade das substâncias isoladas com potencial atividade antileishmania sobre macrófagos J774G₈ e hemácias humanas;
 - Verificar alterações morfológicas e ultraestruturais de *L. amazonensis* tratadas com as substâncias isoladas, por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
 - Determinar se os compostos isolados agem na despolarização da membrana mitocondrial ou na membrana citoplasmática de *L. amazonensis*, pela citometria de fluxo e empregando-se os marcadores rodamina 123 e iodeto de propídio, respectivamente.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREDE-NARVAEZ, F. J. et al. The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 47, n.4, p. 191-194, 2005.
- ARORA, D. R.; ARORA, B. **Medical parasitology**. New Delhi: CBS Publishers, 2007.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328 – 337, 2004.
- BECK, J. T.; ULLMAN, B. Biopterin conversion to reduced folates by *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 49, p. 21-28, 1991.
- BENTE, M.; HARDER, S.; WIESGIGL, M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proteomics**, Oxford, v. 3, p.1811–1829, 2003.
- BLUM, J. A.; HATZ, C. F. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of Travel Medicine**, Hamilton, v.16, p.123-131, 2009.
- BOELAERT, M. et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, p. 30–37, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Doenças negligenciadas**: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n.1, p. 200-202, 2010.
- BRENZAN, M. A. et al. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 101, p. 715-722, 2007.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 1, p. 34-37, 2003.

CARTER, N. S. et al. Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, p. 20935–20941, 2000.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 56, p. 315-325, 1994.

CARVALHO, E. M. et al. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v. 53, p. 273-277, 1995.

CASTRO-PINTO, D. B. et al. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, London, v. 19, n. 1, p. 57-63, 2004.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Parasites – Leishmaniasis: Disease**. Clifton, 2010a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>> Acesso em: 20 out. 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Parasites – Leishmaniasis: Epidemiology & Risk Factors**, Clifton, 2010b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>>. Acesso em: 08 fev. 2011.

CHAN, M. J.; PEÑA, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, London, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of parasitic diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, Lucknow, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2010.

CHOI, C. ; LERNER, E. Leishmaniasis. **The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, Cambridge, v. 6, p. 175-182, 2001.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, Flórida, v. 2, p. 124-126, 2010.

CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 87, p. 444-448, 1993.

COSTA, J. M. L. et al. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos e clínico-evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 115-123, 1992.

- DAS, A. et al. Topoisomerase of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends in Parasitology**, Oxford, 2004, v. 20, p. 381–387.
- EVANS, T.; REIS, M. F.; ALENCAR, J. E. American visceral leishmaniasis (kalazar). **The Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 142, p. 177-181, 1985.
- FABER, W. R.; et al., Value diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 49, p. 70-74, 2003.
- FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, Washington, v. 227, p. 1485–1487, 1985.
- FONSECA, M. C. M.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 9, n. 2, p. 75-79, 2007.
- FONSECA, M. C. M.; MEIRA, R. M. S. A.; CASALI, V. W. D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 707-713, 2006.
- FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: MACHADO-PINTO, J. **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda., 1994. p. 319-328.
- GENESTRA, M. et al. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 8, p.1-6, 2003.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GREVELINK, S. A.; LERNER, E. Leishmaniasis. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 34, p. 257-72, 1996.
- GUILLET, G.; BÉLANGER, A.; ARNASON, J. T. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): Identification, localization and insecticidal synergism with α-terthienyl. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 2, p.423-429, 1998.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 2, n. 354, p. 1191–1199, 1999.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Cia. Editora Nacional, 1979.

- JORGE, A. S. et al. Crude extract of “cravinho” [*Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.] show activity against *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 298, 1998.
- KAFETZIS, D. A.; MALTEZOU, H. C. Visceral leishmaniasis in paediatrics. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 15, p. 289–294, 2002.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of two γ -pyrones from *Podolepsis hieracioides* (Asteraceae). **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 86 p.105-107, 2003.
- KISSMAN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1997.
- KUMAR, R. et al. Cutaneous leishmaniasis in Nepal: *Leishmania major* as a cause. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 2, p. 202-203, 2008.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of genus Leishmania (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, São Paulo, v. 44, 94-106, 1992.
- LIMA, G. M. et al. Assessment of antinociceptive and antiinflammatory activities of *Porophyllum ruderale* aqueous extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 21, n. 3, p. 486-490, 2011.
- LIMA-NETO, D. A. **Estudo fitoquímico e efeitos analgésicos da Planta *Porophyllum ruderale***. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1996.
- MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil**: Guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, krao e cayua. 290 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- MALTEZOU, H. C. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, Saif Zone, v. 3, p. 192–198, 2008.
- MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis. In: MALTEZOU, H. C.; GIKAS, A. **Tropical and emerging infectious diseases**. Kerala: Research Signpost, 2010. p. 163–185.
- MALTEZOU, H. C. et al. Visceral leishmaniasis during childhood in Southern Greece. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, p. 1139–1143, 2000.
- MARKLE, M. H.; MARKHOUL, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. **American Pharmacist Physician/GP**, Kansas City, v. 69, p. 1455–1460, 2004.

- MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil:** Guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, krao e cayua. 290 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“Espundia”, Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p. 859-876, 1986.
- MARZOCHI, M. C. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Journal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.
- MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthropozoonosis and for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.
- MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three asteraceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 135-144, 2006.
- MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2010.
- MINODIER, P. et al. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 17, p. 701–704, 1998.
- MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, Aberdeen, v. 1, p. 9-19, 2009.
- MONZOTE, L. et al. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 61, n. 2-3, p.148-153, 2007.
- MOTTA, M .C. M. Kinetoplast as a Potential Chemotherapeutic Target of Trypanosomatids. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 14, n. 9, p. 847-854, 2008.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 375–381, 2004.
- NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 16, p. 61-66, 2006.

- OLLIARO, P. L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis :a systemic review of clinical studies done in India,1980–2004. The **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 5, p. 763–74, 2005.
- OMS. Organizacion Mundial de la Salud. **Lucha contra las leishmaniasis**. Ginebra: OMS, 1990.
- OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 127–151, 1987.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers.. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 12, p. 1032-1039, 2010.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 22, p. 1-13, 1996.
- POLONIO T., EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 22, p. 277-286, 2008.
- RASO, P.; GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BRASILEIRO FILHO, G. et al. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- RITMEIJER, K. et al. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 43, p. 357–364, 2006.
- RONDÓN, M. E. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. collected in Venezuela. **Ciencia**, v.16, n. 1, p. 5-9, 2008.
- ROSA, M. B. et al. Estudo espectrofotométrico da atividade protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 1, p. 101-110, 2008.
- SAAR, Y.; RANSFORD, A.; WALDMAN, E. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 95, p. 9–20, p.1998.
- SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infectious Agents and Diseases**, New York, v. 1, p. 200–206, 1992.
- SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 13, n. 21, p. 2571-2598, 2006.

SANTOS, O. D. et al. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlim, v. 103, p. 1-10, 2008a.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, p.277-281, 2008b.

SHUNKLA, A. K. et al. Rational approaches for drug designing against Leishmaniasis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, p. 2208–2218, 2010.

SILVA, J. R.; AKISUE, G. AKISUE, M. K.. Padronização da droga e do extrato fluido de *Porophyllum ruderale* Cass. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 14, n. 2, p. 95-108, 1996.

SILVA, S. A. R.; ARAÚJO, L. C. L.; AKISUE, M. K. **Estudo das atividades farmacológicas (antiinflamatória e antiulcerogênica) e determinação da toxicidade aguda do extrato bruto hidroalcoólico de Porophyllum ruderale (Jacq.) Cassini**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996. **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 49, p. 55-60, 2003.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, p. 45, p. 556–561, 2007.

TAKAHASHI, H.T. et al., Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 5, p. 3469-3478, 2011.

THAKUR, C. P. Socio economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, p. 156–157, 2000.

TIUMAN, T. S. et al. Studies on effectiveness of *Tanacetum parthenium* against *Leishmania amazonensis*. **Acta Protozoologica**, Kraków, v. 44, p. 245-251, 2005.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 15, n. 8, p. 525-532, 2011.

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**, Limerick, v. 133, p. 420-425, 2011.

TONIN, L. T. D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted-beta-carboline)-3-carboxamides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 64, p. 386-389, 2010.

- VAN DER MEIDE, W. et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 46, p. 73-78, 2008.
- VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, Seattle, v. 8, p. 297-318, 2002.
- VASUDEVAN, G. et al. Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 9873-9878, 1998.
- VASUDEVAN, G.; ULLMAN, B.; LANDFEAR, S. M. Point mutations in a nucleoside transporter gene from *Leishmania donovani* confer drug resistance and alter substrate selectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 6092-6097, 2001.
- VEGA-LOPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 16, p. 97-101, 2003.
- VIANNIA, G. Sobre uma espécie de *Leishmania*. **Brasil Médico**, v. 25, p. 411, 1912.
- YOUSSEF, S. et al. Unilateral erythema nodosum and homolateral cutaneous leishmaniasis. **Médecine et maladies infectieuses**, Paris, v. 39, n. 9, 739-740, 2009.
- WAGNER, S.; SUTER, A.; MERFORT, I. Skin penetration studies of arnica preparations and of their sesquiterpene lactones. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 10, p. 897-903, 2004.
- WHO. World Health Organization. **Life in twenty first century**: a vision for all. World Health Report. World Health Organization: Geneva, 1998.

Article

5. Thiophene Derivatives with Antileishmanial Activity Isolated from Aerial Parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.

Helena Teru Takahashi ¹, Cláudio Roberto Novello ², Tânia Ueda-Nakamura ^{1,3}, Benedito Prado Dias Filho ^{1,3}, João Carlos Palazzo de Mello ^{1,2} and Celso Vataru Nakamura ^{1,3,*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brazil; E-Mail: helenatakahashi@yahoo.com.br (H.T.T.); mello@uem.br (J.C.P.M.)

² Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil; E-Mail: crnovello@uem.br

³ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil; E-Mails: tunakamura@uem.br (T.U.N.); bpdfilho@uem.br (B.P.D.F.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: cvnakamura@uem.br; Tel.: +55 44 3011-5012; +55 44 3011-5941.

Received: 21 February 2011; in revised form: 22 March 2011 / Accepted: 20 April 2011 /

Published: 2011

Abstract: *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. is a plant native to Brazil and in the northwest region of the state of Paraná, Brazil, aerial parts of *P. ruderale* have been used popularly in the treatment of lesions caused by *Leishmania* sp.. In this study the antileishmanial and cytotoxic activities of the crude extract, fractions, and isolated compounds from aerial parts of *P. ruderale* was evaluated. The dichloromethane extract was submitted to chromatography to yield compounds active against *Leishmania amazonensis*. Their structures were established by comparison of their spectroscopic data with literature values. The activities of crude extract against promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis*

(IC_{50}) were 60.3 and 77.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Its cytotoxic activity against macrophage cells (CC_{50}) was 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The thiophene derivatives isolated were: 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene (compound **A**) and 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2'-bithiophene (compound **B**). The activity of compound **A** against promastigote and axenic amastigote forms were 7.7 and 19.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and of compound **B** were 21.3 and 28.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The activity of the isolated compounds against promastigote and axenic amastigote forms was better than that of the crude extract and more selective against protozoa than for macrophage cells.

Keywords: *Porophyllum ruderale*; antileishmanial activity; thiophene derivatives; *Leishmania amazonensis*

1. Introduction

Leishmaniasis is an infection caused by protozoa of the genus *Leishmania*, showing several clinical forms: cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), and visceral (VL) leishmaniasis. This parasitic disease is prevalent in 88 countries (72 of them developing countries) and affects more than 12 million people. More than 90% of VL patients are located in India, Sudan, Brazil, and Bangladesh [1]. Leishmaniasis is a major health problem worldwide, and can be fatal when untreated [2-4].

The treatment of leishmaniasis is difficult because of the intramacrophagic location of the infective form. Victims of this illness are usually immunodeficient and are not able to eliminate the parasites through a natural mechanism of defense. Moreover, malnutrition is associated with certain cases of leishmaniasis. Concurrent infections such as malaria and pneumonia increase the fatality rate of the illness if it is not promptly diagnosed and treated. The problem of leishmaniasis has been worsened by the spread of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), due to parallel infections in AIDS patients; as well as by the development of drug resistance by the parasites [5,6]. No vaccines are available for any form of the disease, and the chemotherapy is still inadequate and expensive [7], therefore there is an urgent need for new chemotherapeutic drugs for the treatment of these diseases, which mainly affect people in developing countries.

Extensive studies have shown that medicinal plants in several regions of the world contain compounds active against protozoa [8]. *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae) is a medium-sized ruderal aromatic herb shrub with a strong fragrance

[9]. It is native to Brazil, where it is considered invasive because it adapts to many soil types, including poor and sandy ones, and is common in the southeastern region of the country [10]. It is used in folk medicine against leishmaniasis, for cicatrization, general pain, and internal bruising [11,12]. Some pharmacological activities have been evaluated, including anti-inflammatory [13], insecticidal [14], analgesic and antispasmodic [15], antifungal and antibacterial [16], and photoprotective properties [17]. In the northwest region of the state of Paraná (Brazil), aerial parts from *P. ruderale* have been used popularly in the treatment of lesions caused by *Leishmania* sp. [12]. In the present study, we evaluated the *in vitro* antileishmanial and cytotoxic activities against J774G₈ macrophage cells of the crude extracts, fractions, and two thiophene derivatives isolated from aerial parts of *P. ruderale*.

2. Results and Discussion

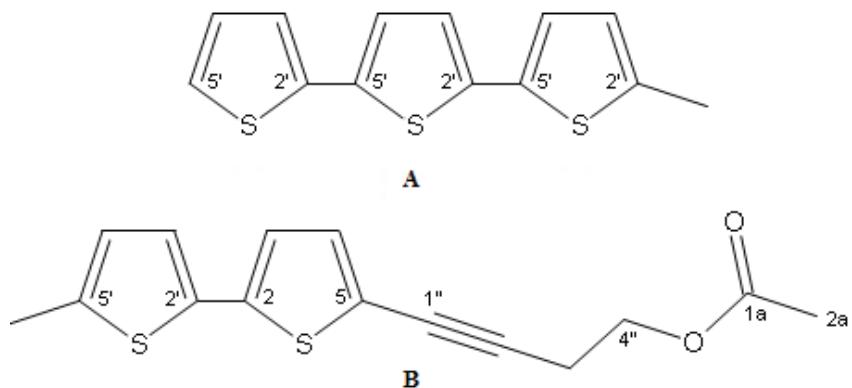
Although leishmaniasis has been known for a long time [18], it is still considered a public health problem, mainly in developing countries. Brazil is among the countries with the highest reported incidence rates, with a mean of 28,000 new cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and 2,000 new cases of visceral leishmaniasis (VL) per year [19]. A new CL endemic zone was recently reported in city of Prudentópolis in the central part of the state of Paraná in southern Brazil [20].

The available chemotherapy for treatment of leishmaniasis is not very effective, and is highly toxic to patients. Therefore, there is an immediate need for new treatment alternatives [7]. Approximately 80% of the world population uses traditional medicine, primarily based on natural products [21]. According to Rocha *et al.* [22], the potent leishmanicidal activities of chemically defined molecules isolated from natural origins represent an exciting advance in the search for novel antiprotozoal agents, at a time when the need for new innovative drug leads is urgent. In addition, the costs of treating this disease need to be reduced as much as possible, to allow treatments to be disseminated and used mainly in poorer countries, where there is a high incidence of this disease [23].

Previous phytochemical analysis of *P. ruderale* showed the presence of several constituents, including: essential oils [13,16], monoterpenes and sesquiterpenes [14], carotenoids, fatty acids, alkaloids, coumarins, catechin tannins, quaternary amines, flavonoid and aglycone flavones, anthocyanins, polysaccharides, triterpene or steroid saponins, and mucilage [15]. In the present study, we isolated two

compounds by chromatographic separation of a dichloromethane extract of aerial parts from *P. ruderale*, which were identified by their MS and NMR spectra analysis as thiophene derivatives: 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene and 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2'-bithiophene. Both compounds were more active than the crude dichloromethane extract or the active fraction obtained from *P. ruderale*. Terthiophene derivatives isolated from plants have shown antifungal [24,25] and antibacterial activity [26]. Terthiophenes and polyenes isolated from species of the family Asteraceae have shown activity against microorganisms, viruses, and tumor cells [27].

Figure 1. Structures of the thiophene derivatives isolated from *P. ruderale*
(A) 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene; **(B)** 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2' bi-thiophene.



Marotti *et al.* [28] isolated thiophene and polyacetylenic compounds from species of *Tagetes*. These compounds showed strong biocidal activity, thus making *Tagetes* plants very useful for suppressing soil nematode populations and as sources of natural pesticides.

The effect of the crude extract obtained from the aerial parts of *P. ruderale* was verified on the growth of *L. amazonensis*. The dichloromethane extract inhibited the growth of the promastigote and axenic amastigote forms. The bioguided fractionation led to isolation of thiophene derivative compounds (**A** and **B**) that showed better activity than the crude extract against both forms of the parasite (Table 1).

Table 1. Effects of the dichloromethane extract, active fraction and thiophene derivatives on the growth of promastigote (PRO) and axenic amastigote forms (AMA) of *L. amazonensis* and cytotoxicity to J774G₈ Macrophage Cells.

	IC₅₀ (µg/mL)		CC₅₀ (µg/mL)	SI	
	PRO	AMA	Macrophages	PRO	AMA
Dichloromethane extract	60.3 ± 9.2	77.7 ± 7.7	500 ± 50	8.3	6.5
Active fraction	57.5 ± 4.5	72.5 ± 7.5	440 ± 56.6	7.6	7.8
Compound A	7.7 ± 1.7	19.0 ± 4.7	370 ± 50	48.2	19.1
Compound B	21.3 ± 4.4	28.7 ± 2.6	335 ± 15	15.7	11.7
Amphotericin B	0.06 ± 0.0	0.23 ± 0.0	ND	ND	ND

Jorge *et al.* [12] investigated the activity of crude extract of *P. ruderale* against promastigote forms of *L. braziliensis* and observed an inhibition of 22.7%, 41.0% and 63.6% at 24, 48 and 72 h of incubation with concentrations of 1.5 and 2.5 mg/mL. In the present study, 60.3 µg/mL of dichloromethane extract of *P. ruderale* inhibited 50% of promastigote forms of *L. amazonensis* after 72 h of incubation.

The thiophene derivatives: 5-(4-hydroxy-1-butynyl)-2,2'-bithienyl and 5-(4-acetoxy-1-butynyl)-2,2'-buthienyl from *Tagetes mendocina* (Asteraceae) showed antiprotozoal activity against *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* and *L. infantum* promastigotes with 100% lysis at 100 µg/mL [29]. In our study, we found a 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) against *L. amazonensis* of 7.7 and 21.3 µg/mL for compounds **A** and **B**, respectively. The IC₅₀ values for the positive control, amphotericin B, were relatively low, at 0.060 µg/mL against the promastigotes and 0.23 µg/mL against the amastigotes.

The cytotoxic effects of the dichloromethane extract, active fractions, and two thiophene derivatives were evaluated by the sulforhodamine B method. The 50% cytotoxic concentrations were determined, and the activities against the protozoa were compared using the selectivity index (SI) ratio (CC₅₀ J774G₈ cells/IC₅₀ protozoa). Cytotoxicity assays demonstrated that compounds **A** and **B** were 48.2 and 15.7 times more toxic to promastigotes and 19.1 and 11.7 times more toxic to

intracellular amastigote forms, respectively, than to the J774G₈ macrophage cells (Table 1).

In view of the present clinical scenario, it is desirable to develop new drugs that are affordable, less toxic, and more effective. In developing countries, people are almost completely dependent on traditional medical practices for their primary health care, and higher plants remain the main source of drug therapy in traditional medicine. The recognition and validation of traditional medical practices and the search for plant-derived drugs could lead to the development of new strategies for leishmaniasis control and treatment [22,30-32]. In recent years, several studies with plants used in folk medicine have been performed to assess their antileishmanial activity [33-37].

In the northwest of Paraná, the aqueous, hydroalcoholic or even the juice of fresh aerial parts of *P. ruderale* has been popularly employed in the treatment of leishmaniasis by applying the same on skin lesions caused by *Leishmania* sp. In our *in vitro* study, we found that the dichloromethane extract of *P. ruderale* as well as the isolated compounds inhibited the growth of promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*. These are likely candidates for selection as lead compounds for the development of new drugs against leishmaniasis; however, their antileishmanial activity, toxicity *in vivo*, and their detailed mechanism of action must all be evaluated with care.

3. Experimental

3.1. General

The NMR spectra were obtained in a Varian Gemini 300 (7.05T) instrument using CDCl₃ as the solvent for field homogeneity, TMS as the internal standard, and a constant temperature of 298 K. For HMBC the coupling constants were optimized for 4, 6, 8, and 12 Hz. ESI-MS was recorded in a Quattro LCZ Micromass mass spectrometer (Waters, Manchester, UK).

3.2. Plant material

Aerial parts of *P. ruderale* were collected in Cascavel, Paraná, Brazil, in 2009. An exsiccate of the collected and identified plant was deposited and authenticated at the

Herbarium of the State University of Maringá, Maringá, Brazil, under number HUEM 10074.

3.3. Preparation of dichloromethane extract

Aerial parts (2,900 g) from *P. ruderale* were collected, cut into small pieces with scissors, and extracted by dynamic maceration with 12.5% (v/w) dichloromethane (Synth[®]) at room temperature in the dark for 2 days, resulting in a greenish solution. This extract was filtered on filter paper (Whatman 40[®]), concentrated under reduced pressure at a temperature lower than 40 °C, and lyophilized to give 22.96 g of dried extract (0.79%). This dichloromethane extract was submitted to VLC.

3.4. Isolation and identification of active compounds

The dichloromethane extract (1.5 g) was added to a silica-gel 60 (0.063–0.200 mm, Merck[®]) Vacuum Liquid Chromatography (VLC) column (40 cm × 1.8 cm) and eluted successively with petroleum ether, petroleum ether-diethyl ether (15:1; 10:1; 7:1; 1:1 v/v), diethyl ether, diethyl ether-methanol (1:1), ethyl acetate-methanol (8:2; 1:1 v/v), and methanol. The fractions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using silica gel F₂₅₄ plates (Merck) and the following eluent systems: hexane-petroleum ether (5:1 v/v); and petroleum ether-diethyl ether (2:1; 2:1.5; 1:1 v/v). Similar fractions were combined, yielding 18 fractions (F₁ to F₁₈). The F₃ fraction (12.8 mg, 0.007%) was identified as 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene by NMR and mass spectroscopy (MS) analysis. The active fraction F₁₃ (175.0 mg) was separated by column chromatography (CC, 64 × 1.0 cm) with silica-gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck) and eluted with petroleum ether-diethyl ether (9:1 v/v). Fractions were checked by TLC using hexane-petroleum ether (5:1 v/v); and petroleum ether-diethyl ether (1:0.2, 1:0.5 v/v) as eluents and similar ones were combined to obtain 16 subfractions (F_{13.1} to F_{13.16}). Subfraction F_{13.7} (35.5 mg, 0.018%) was identified by MS and NMR analysis as 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2' bisthiophene–compound **B**.

5-Methyl-2,2':5',2"-terthiophene (A) [38]. Viscous yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ δ : 2.47 (3H, bs, 5-Me), 6.65 (1H, dd, J = 3.6, 1.2 Hz, H-4), 6.95 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3'), 6.97 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 7.00 (1H, dd, J = 5.1, 3.6 Hz, H-3''), 7.04 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-4'), 7.14 (1H, dd, J = 3.6, 0.9 Hz, H-4''), 7.19 (1H, dd, J = 5.1, 0.9 Hz, H-5''). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 15.6 (5-Me), 123.6 (C-4''), 123.7 (C-3'), 123.8 (C-4'), 124.4 (C-3''), 124.5 (C-5''), 126.2 (C-4), 128.0 (C-3), 135.0 (C-2), 135.7 (C-5'), 136.9 (C-2'), 139.6 (C-5), 137.5 (C-2''). ESI-MS m/z (Rel. Int. %): 185 (15), 229 (25), 263 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (36), 262 (100). Molecular formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{S}_3$.

5'-Methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2'-bi-thiophene (B) [39]. Yellow oil. $^1\text{H-NMR}$ δ : 2.10 (3H, s, H-2a), 2.47 (3H, d, J = 0.9 Hz, 5'-Me), 2.78 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-3''), 4.26 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-4''), 6.65 (1H, dd, J = 3.6, 1.2 Hz, H-4'), 6.90 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 6.95 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3'), 7.01 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 15.57 (5'-Me), 20.5 (C-3''), 21.1 (C-2a), 62.3 (C-4''), 77.6 (C-1''), 90.6 (C-2''), 121.6 (C-5), 122.7 (C-3), 124.2 (C-3'), 126.3 (C-4'), 132.6 (C-4), 140 (C-5'), 171.1 (C=O). ESI-MS m/z (Rel. Int. %): 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (10), 301 (26), 245 (33), 229 (73), 313 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100). Molecular formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{S}_2\text{O}_2$.

3.5. Antileishmanial activity

3.5.1. Antipromastigote activity

L. amazonensis promastigotes (strain WHOM/BR/75/JOSEFA) were grown at 25 °C in Warren's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), for 48 h. The cells were harvested, resuspended in fresh medium, counted in a Neubauer chamber, and adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/mL. To evaluate biological activities, the following concentrations were used: from 10 to 1,000 µg/mL for crude extracts, 10 to 500 µg/mL for fractions, and 1 to 100 µg/mL for isolated compounds; all were aseptically solubilized in Dimethylsulfoxide (DMSO) - the highest concentration used was 1.0% v/v and incubated at 25 °C. After 72 h of incubation, the parasites were counted in a Neubauer chamber. All tests were done in duplicate. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) represents the concentration that causes 50% inhibition in parasite growth.

3.5.2. Anti-amastigote activity

Axenic amastigotes were cultured in Schneider's Insect Medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), supplemented with 20% inactivated FBS containing dichloromethane extract or thiophene derivatives in 12-well microplates at 32 °C, for 72 h. The cell density for each treatment was determined in a hemocytometer (Improved Double Neubauer) with an optical microscope. In all tests, 1% DMSO (Sigma Chemical Co), at the concentration applied to dissolve the highest dose of the compounds that had no effect on cell proliferation, and medium alone were used as controls. Each experiment was performed in triplicate on three different occasions.

3.6. Cytotoxicity and selectivity index

The cytotoxicity test was performed according to Skehan *et al.* [40]. A suspension of 5×10^4 J774G₈ macrophage cells in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS was added to each well in a 96-well microplate. The plates were incubated in a 5% CO₂-air mixture at 37 °C to obtain confluent growth of the cells. After 24 h, the medium was removed, and one of several concentrations of the crude extract (100 to 5,000 µg/mL), active fraction, or isolated compounds (10 to 1,000 µg/mL) was added to each well containing the cells, and the plates were incubated for 48 h. The nonadherent cells were removed by washing with RPMI 1640 medium, and the adhered macrophages were fixed with 50 µL/well of 10% trichloroacetic acid at 4 °C for 1 h; after that, they were washed with water, and 50 µL/well of sulforhodamine B (0.4% w/v) was added; the microplate was then maintained at 4 °C for 30 min. Next, the sulforhodamine B was removed, and the microplate was washed five times with 1% acetic acid, then 150 µL/well of 10 mM unbuffered Trisbase solution (Sigma Chemical Co.) was added, and it was homogenized for 15 min. Next, the absorbance of each individual well was read in a 96-well plate reader (BIOTEK Power Wave XS) at 530 nm. Each experiment was performed in triplicate on three different occasions. The percentage of viable cells was calculated in relation to the control cultured in the medium alone. The 50% cytotoxicity concentration (CC₅₀) was determined by logarithm regression analysis of the data obtained.

4. Conclusions

Our results showed that the dichloromethane extract, active fraction, and thiophene derivatives isolated from *P. ruderale* exhibit strong activity against promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis*.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), INCT_if, Fundação Araucária, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas of the Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil. We are grateful to Dr Heinrich Luftmann of the University of Münster, Germany, for critical analysis of the mass spectroscopy.

5. References

1. Ioset, J.R. Natural products for neglected diseases: a review. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 643-666.
2. Davidson, R.N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs* **1998**, *56*, 1009-1018.
3. Herwaldt, B.L. Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, *354*, 1191-1199.
4. Renslo, A.R.; McKerrow, J.H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 701-710.
5. Torres-Santos, E.C.S.; Moreira, D.L.; Kaplan, A.M.C.; Meirelles, M.N. Rossi-Bergmann, B. Selective effect of 20,60 dihydroxy-40-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1234-1241.
6. Carvalho, P.B.; Arribas, M.A.G.; Ferreira, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2000**, *36*, 69-96.
7. Croft, S.L.; Yardley V. Chemotherapy of leismaniasis. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 319-342.
8. Camacho, M.D.R.; Croft, S.L.; Phillipson, J.D. Natural products as sources of antiprotozoal drugs. *Curr. Op. Anti-Inf. Investig. Drugs* **2000**, *2*, 47-62.

9. Badillo, V. Lista actualizada de las species de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. *Ernstia* **2001**, 11, 191.
10. Kissman, K.G.; Groth, D. *Plantas Infestantes e nocivas*; BASF: São Paulo, Brazil, 1999; pp. 414-417, 392-395.
11. Marquesini, N.R. *Plantas usadas como medicinais pelos indios do Parana e Santa Catarina, Sul do Brasil: Guarani, Kaingang, Xokleng,Ava-Guarani, Krao e Cayua*. Master Thesis, UFPR: Curitiba, Brazil, 1995; p. 361.
12. Jorge, A.S.; Silveira, T.G.V.; Lonardoni, M.V.C.; Arraes, S.M.A.A.; Zanzarini, P.D.; Silva, C.M.; Mello, J.C.P.; Bertolini, D.A. Crude extract of “cravinho” [*Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.] show activity against *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1998**, 93, 298.
13. Souza, M.C.; Siani, A.C.; Ramos, M.F.; Menezes-de-Lima, O.J.; Henriques, M.G. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie* **2003**, 58, 582-586.
14. Guillet, G.; B'elanger, A.; Arnason, J.T. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): identification, localization and insecticidal synergism with alpha-therthienyl. *Phytochemistry* **1998**, 49, 423-429.
15. Lima-Neto, D. A. *Estudo fitoquímico e efeitos analgésicos da Planta Porophyllum ruderale*. PhD Thesis, State of University of Campinas: Piracicaba, Brazil; 1996; p. 92.
16. Rondón, M. E.; Delgado, J.; Velaco, J.; Rojas, J.; Rojas, L.B.; Morales, A.; Carmona, J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. collected in Venezuela. *Ciência* **2008**, 16, 5-9.
17. Rosa, M.B.; Oliveira, T.G.; Carvalho, C.A.; Dias, F.D.; Carvalho, L.M.; Nascimento, P.C.; Peres, R.L. Spectrophotometric study of the photoprotection activity of the *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass and *Sonchus oleraceus* aqueous extracts. *Rev. Eletrônica Farm.* **2008**, 1, 101-110.
18. Deane, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. *Res. Bras. Malariol. Doenças Trop.* **1958**, 10, 431-450.

19. Ministry of Health [Ministério da Saúde, Brasil]. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Saúde: Brasília, Brazil, 2007; p. 180.
20. Soccol, V.T.; Castro, E.A.; Schühli, G.S.; Carvalho, Y. Marques, E.; Pereira, E.F., Alcântara, F.S.; Machado, A.M.; Kowalthukc, W.; Membrived, N.; Luza, E. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. *Acta Trop.* **2009**, *111*, 308-315.
21. Macía, M.J.; García, E.; Vidaurre, P.J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 337-350.
22. Rocha, L.G.; Almeida, J.R.G.S.; Macedo, R.O.; Barbosa-Filho, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 514-535.
23. Santos, D.O.; Coutinho, C.E.R.; Madeira, M.F.; Bottino, C.G.; Vieira, R. T.; Nascimento, S.B., Bernardino, A.; Bourguignon, S.C.; Corte-Real, S.; Pinho, R.T.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C.; Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 1-10.
24. Mares, D.; Romagnoli, C.; Rossi, R.; Carpita, A.; Ciofalo, M.; Bruni, A. Antifungal activity of some 2,2:5',2"-tertiophene derivatives. *Mycoses* **1994**, *37*, 377-383.
25. Fokialakis, N.; Cantrell, C.L.; Duke, S.O.; Skaltsounis, A.L.; Wedge, D.E. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *8*, 1651-5.
26. Ciofalo, M.; Petruso, S.; Schillaci, D. Quantitative assay of photoinduced antibiotic activities of naturally occurring 2,2':5'2"-terthiophenes. *Planta Med.* **1996**, *62*, 374-375.
27. Hudson, J.B.; Graham, E.A.; Rossi, R.; Carpita, A.; Néri, D.; Towers, G.H. Biological activities of terthiophenes and polyynes from the Asteraceae. *Planta Med.* **1993**, *59*, 447-450
28. Marotti, I.; Marotti, M.; Piccaglia, R.; Nastri, A.; Grandi, S.; Dinelli, G. Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1210-1217.
29. Lima, B.; Aguero, M.B.; Zygadlo, J.; Tapia, A.; Solis, C.; Arias, A.R.; Yaluff, G.; Zacchino, S.; Feresin, G.E.; Schmeda-Hirschmann, G. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*, *J. Chil. Chem. Soc.* **2009**, *54*, 1.

30. Akedengue, B., Ngou-Milama, E., Laurens, A., Hocquemiller, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* **1999**, 6, 3-8.
31. Fournet, A.; Munoz, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 1215-1237.
32. Mendonça-Filho, R.R.; Rodrigues, I.A.; Alviano, D.S.; Santos, A.L.S.; Soares, R.M.A.; Alviano, C.S.; Lopes, A.; Rosa, M.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera Linn. (Palmae)*. *Res. Microbiol.* **2004**, 155, 136-143.
33. Tiuman, T.S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V. Studies on effectiveness of *Tanacetum parthenium* against *Leishmania amazonensis*. *Acta Protozool.* **2005**, 44, 245-251.
34. Nakamura, C.V.; Santos, A.O.; Vendrametto, M.C.; Luize, P.S.; Dias-Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Braz. J. Pharmacogn.* **2006**, 16, 61-66.
35. Brenzan M.A.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Ueda-Nakamura, T.; Young M.C.M., Cortez, D.A.G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* **2007**, 101, 715-722.
36. Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga Júnior, V.F.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 120, 204-208.
37. Toledo, C.E.M.; Britta, E.A.; Ceole, L.F.; Silva, E.R.; Mello, J.C.P.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; Ueda-Nakamura, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 133, 420-425.
38. Rossi, R.; Carpita, A.; Ciofalo, M.; Houben, J.L. Synthesis and characterization of 2,2':5',2"-terthiophene derivatives of possible therapeutic use. *Gazz. Chim. Ital.* **1990**, 120, 793-803.
39. Ahmad, V.U.; Alam, N. Acetylenic thiophene derivatives from *Blumea oblique*. *Phytochemistry* **1996**, 42, 773-735.

40. Skehan, P.; Soreng, R.; Scudeiro, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-112.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

6. Artigo II: Antileishmanial activity of 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene isolated from *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. is related to mitochondrion dysfunction in *Leishmania amazonensis*

Helena Teru Takahashi^a, Elizandra Aparecida Britta^a, Tânia Ueda-Nakamura^{a,b},
 Benedito Prado Dias Filho^{a,b}, João Carlos Palazzo de Mello^{a,c}, Celso Vataru
 Nakamura^{a,b*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

^b Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

^c Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

Author to whom correspondence should be addressed: cvnakamura@uem.br;

Phone: +55 44 3011-5012; Fax: +55 44 3011-5046

* Corresponding author at: Departments of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel.:+55 44 3011-5012; fax:+55 44 3011-5046.

E-mail address: cvnakamura@uem.br (C.V. Nakamura).

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases that remains a public health problem worldwide, affecting approximately 12 million people in 88 countries. There is no vaccine against leishmaniasis and the drugs available are too toxic, expensive and difficult to administer. Recently, our group reported the antiproliferative activity in promastigotes and axenic amastigote forms of *Leishmania amazonensis* treated with 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene (compound **A**) and 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2'-bi-thiophene (compound **B**) isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.)

Cass. Here, we demonstrate that both compounds also exhibited activity against intracellular amastigotes and showed a very low toxicity for human cells, even at high concentrations (hemolitic index <10% at 500 µg/ml). Promastigotes treated with compound **A** showed alteration on mitochondrial membrane when observed by flow cytometry through labeling with Rhodamine 123 and confirmed by transmission electron microscopy. Alterations on morphology (rounded cells) were observed by scanning electron microscopy in parasite treated with compounds. Further studies should be performed employing the compounds **A** and **B** for the development of new drugs for chemotherapy of leishmaniasis.

Key-words: antileishmanial, thiophene derivatives, mitochondrion dysfunction

The leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa parasites of the genus *Leishmania* [1]. The overall prevalence is 12 million with an estimated incidence of 1.5 million new cases of cutaneous leishmaniasis per year. Approximately 350 million people, who are often impoverished, are at risk of contracting the disease [2, 3].

More than 17 species of *Leishmania* are capable of causing a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from the cutaneous (CL) to the visceral form (VL) [4]. Currently, the drugs used in leishmaniasis treatment present several problems, including high toxicity and many adverse effects, leading to patients withdrawing from treatment and emergence of resistant strains. In addition to these problems, the high cost of the compounds makes the treatment far from suitable and, regrettably, it has been increasing gradually throughout the years [5,6]. In addition, no vaccine against leishmaniasis is available [7]. Pharmaceutical research on natural products represents a major strategy for discovering and developing new drugs and plant-

based remedies that might be safer, cheaper, and less toxic than existing prescription medicines [8].

Among the plants used popularly for the treatment of leishmaniasis, aerial parts from *P. ruderale* have been used on lesions caused by *Leishmania* sp. [9]. *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., is a shrub of 1.50 m of height approximately and it is characterized by its strong fragrance [10]. Its reproduction is exclusively by seed, creeping perennial crop areas, roadsides and vacant lots [11,12]. Although the activity of thiophene derivatives against promastigotes has been reported previously [13], the mechanism involved on the antileishmanial effect are still unknown. In order to search for new alternative agents for the treatment of leishmaniasis, the aim of this work was to determine the action of thiophene derivatives isolated from aerial parts of *P. ruderale* against intracellular amastigote of *L. amazonensis* and determine the possible mechanism of action of the compounds by scanning and transmission electron microscopy and flow cytometry techniques in promastigote forms.

Materials and Methods

Compounds

The thiophene derivatives: 5-methyl-2,2':5',2"-terthiophene (compound **A**) and 5'-methyl-[5-(4-acetoxy-1-butynyl)]-2,2'-bi-thiophene (compound **B**), were isolated from aerial parts of *P. ruderale* according with Takahashi *et al.* [13].

Activity against intracellular amastigotes

Peritoneal macrophages from male BALB/c mice (6–8 weeks of age) were collected with 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), harvested in RPMI 1640 medium pH 7.6

supplemented with 10% FBS (5×10^5 cells/ml) and plated on 13 mm coverslips in a 24-wells culture plates for adherence at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere during 12 hours. Non-adherent cells were then removed and adhered macrophages cultured for 12-16 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. Next, macrophages were infected in multiples of 10 promastigotes per host cell and incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. After 6 h, infected macrophages were treated with different concentrations of compounds **A** or **B**: 20; 50 and 100 µg/ml. After 24 h, the monolayers were fixed with methanol, and stained with Giemsa. The number of amastigotes was determined by counting at least 200 macrophages in duplicate cultures, and results were expressed as the inhibition index (the percentage of infected macrophages by the mean number of internalized parasites per cell). These tests were performed in duplicate on separate occasions.

Hemolysis assay

Human erythrocytes from a healthy donor (type A) were collected and washed with saline solution containing 1% glucose (SSG) and buffered to pH 7.25. To determine the hemolytic activity, erythrocytes were diluted in saline solution containing 1% glucose, resulting a 3% erythrocyte suspension that was incubated for 2 h with the compounds **A**, **B**, or amphotericin B in 96-well U-shaped microplates at 37 °C. The concentrations tested were: 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml. Hemolysis was determined by reading the absorbance of the supernatant from each well with a spectrophotometer at 550 nm. The positive control (100% hemolysis) and negative control (0% hemolysis) were also determined by incubating erythrocytes with 1% Triton X-100 in SSG and SSG alone, respectively [14,15].

FACScan analysis

For analysis of the membrane integrity after thiophene derivatives treatment, promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* (5.0×10^6 cells in Warren or Schneider's media) were harvested at log phase, mixed with thiophene derivatives at a concentration of 50 to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 3 h at 25 and 32 °C, for promastigote and axenic amastigote forms, respectively. Rhodamine 123 (5 mg/ml for 15 min at 37 °C) was used to analyses of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP – 5 μM) was used as positive control. Permeabilization of the cell membrane was detected by incubation of the thiophene derivatives treated cells in propidium iodide (PI, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 5 min) followed by removal of unbound dye through excessive washing with PBS. Amphotericin B (200 μM) was used as positive control. The mean of fluorescence intensity of the cells was analyzed by flow cytometry FACSCalibur and CellQuest software. A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to the parasites.

Scanning electron microscopy

After treatment with IC₅₀ and IC₉₀ values of compound **A** (7 and 96 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively) and IC₅₀ and IC₉₀ values of compound **B** (21 and 115 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 72 h, promastigotes were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 h. The parasites were washed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer, placed on the poly-L-lysine-coated coverslip, dehydrated in different concentrations of ethanol, critical point-dried in CO₂, sputter-coated with gold and observed in a Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

Transmission Electron Microscopy

Cultured promastigotes (1×10^6 cells/ml, in Warren's medium) were treated with IC₅₀ and IC₉₀ values of compounds **A** and **B**, for 72 h at 25 °C, before being fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, at pH 7.2.

For transmission electron microscopy (TEM), the cells were then postfixed for 40 min, in 0.1 M cacodylate buffer containing 1% (w/v) OsO₄ and 0.8% (w/v) potassium ferrocyanide, before being dehydrated in acetone, and embedded in Epon resin (Fluka, Steinheim, Germany). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined in JEOL-1400 transmission electron microscope.

Statistical Analysis

All tests were performed in triplicate. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 4 software package (GraphPad Software, San Diego, CA), with Student's *t* tests used to make comparisons. A *p*-value of <0.05 was considered indicative of a statistically significant difference.

Results

The thiophene derivatives showed antiprotozoa activity against *Leishmania amazonensis* without causing hemolysis in human erythrocytes

The present study was undertaken to evaluate the effects of the two thiophene derivatives against *L. amazonensis*. The effects of the compounds **A** and **B** on intracellular amastigote forms were observed during 24 h of incubation. The treatment with 20, 50, and 100 µg/ml of compound **A** resulted in decreased survival index of 62, 37, and 16%, respectively (Figure 1), compared to the control. The intracellular amastigote forms treated with 20, 50, and 100 µg/ml of compound **B**

resulted in 66, 51, and 24% in the survival index. IC₅₀ values were 37 and 51 µg/ml for compounds **A** and **B**, respectively. We compared the survival index of cells treated with both compounds: all results were significant ($p<0.05$) when compared with the negative control (Figure 1).

When we evaluated the potential of compounds **A** and **B** to cause hemolysis in human erythrocytes, both compounds showed low levels of toxicity (Figure 2). The hemolytic index values were lower than amphotericin B ($p<0.05$) employed for comparation, even at the highest concentrations (hemolytic index < 10% at 500 µg/ml).

Thiophene derivative compound A, but not compound B caused mitochondrial membrane changes in promastigote and axenic amastigote forms of *Leishmania amazonensis*

Promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* were treated with thiophene derivatives **A** and **B** and analysed by Flow Cytometry to evaluate the antileishmanial effect comparing with negative and positive controls. Rhodamine 123 (5 mg/ml) and propidium iodide (20 µg/ml) were used as labeling for evaluate mitochondrion membrane potential and cytoplasmic membrane integrity.

Promastigote forms of *L. amazonensis* treated with compound **A** showed intense labeling of the mitochondrion with Rhodamine 123 (Figure 3C). Axenic amastigote forms treated with compounds **A** also showed as positive when labeled with rhodamine 123 (data not shown). Similarly, a decrease in membrane potentials was also observed following treatment with the standard drug Carbonyl Cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Figure 3B)..On the other hand, compound **B** caused

no change in the cell and mitochondrial membrane (Figure 3D) similarly untreated control cells when maintained the membrane potential (Figure 3A).

Changes in mitochondrial membrane promastigote and axenic amastigote forms treated with compound **A** were confirmed by transmission electron microscopy, where we observed swelling of the mitochondria (Figure 3E-G).

When promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* were treated with compounds **A** or **B** and labeled with propidium iodide, the results were negative, i.e., no change was detected on the cytoplasmic membrane of *L. amazonensis* (Figure 4C and D).

Promastigote forms were treated with thiophene derivatives and processed for analysis by scanning electron microscopy. Parasites exposed to compounds **A** and **B** had aberrant morphologies. These alterations were progressive with increasing drug concentrations. The SEM-based examination of promastigotes that had been exposed to the thiophene derivatives revealed several structural changes, such as rounded and swollen cells (Figure 5).

Discussion

Leishmania is a heteroxenic parasite with extracellular motile promastigotes present in the alimentary tract of insect vector, and intracellular non-motile amastigotes, which live in the mononuclear phagocytes of mammalian hosts [4]. Amastigotes are responsible for all clinical manifestations in the vertebrate host; therefore vaccines and chemotherapeutic target need to be developed against this stage of parasite [16,17]. So, the antileishmanial activity should be evaluated for this last form.

Kayser *et al.* [18] isolated two γ -pyrones from the seeds of *Podolepsis hieracioides* and tested their *in vitro* leishmanicidal activities against promastigote forms of *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum* and *L. enriettii* and found an IC₅₀ value between 3.76 and 5.43 μ g/ml. Against amastigote forms of *L. donovani* residing within RAW 264.7 macrophage-like host cells, an IC₅₀ between 8.29 and 8.59 μ g/ml. Other compounds with antileishmanial activity had been isolated from plants of the Asteraceae [19,20].

The hemolysis assay can be used as an *in vitro* method to predict toxicity prior to use *in vivo* studies for toxicological evaluation [21]. Both thiophene derivatives showed a lower toxicity compared with amphotericin B. Our group had tested the cytotoxicity effect of both compounds to J774G₈ macrophage cells and CC₅₀ values were 370 and 335 μ g/ml for compounds **A** and **B**, respectively [13].

Several works have been focused on understanding the effect of different drug-treatments on these parasitic protozoa. Organelles and structures such as mitochondrion, kinetoplast, apicoplast, glycosome, acidocalcisome, hydrogenosome, plasma membrane and the cytoskeleton have been studied using different approaches to identify new targets for the development of new chemotherapeutic agents that are required [22].

Mitochondria of trypanosomatidae parasites exhibit unique structural and functional features that are remarkably distinct from mammalian mitochondria, making this organelle an exceptionally attractive chemotherapeutical target [23]. Here, we demonstrate that compound **A** has their antileishmanial action on parasite mitochondrial membrane, affecting the organelle function. Hu *et al.* [24] synthesized eighteen diamidino azaterphenyls and analogues were tested against axenic amastigote forms of *L. donovani*. The most active compound showed an IC₅₀ value of

0.27 μM . Axenic amastigote forms of *L. donovani* treated with 0.68 μM ($2.5 \times \text{IC}_{50}$ value) with the most active compound, when processed for transmission electron microscopy, they observed that majority of parasites exposed displayed a dramatic dilation of the mitochondrion and an evidence of a disintegrating kinetoplast [24]. Edelfosine treatment altered the mitochondrion ultrastructure followed by changes in the mitochondrial potential observed using Rhodamine 123 and flow cytometry analysis, which probably indicates a mechanism of apoptosis-like cell death [14, 25].

Nine natural and synthetic 2, 2':5,2''- terthiophenes were tested against the dermatophyte *Microsporum cookie*. The more active compounds were 3'- methoxy 2,2':5,2''-terthiophene and 3'-methythio-2,2':5,2''-terthiophene. Transmission electron microscopic observations demonstrated the photoactive nature of synthetic molecules to be similar that the α -terthienyl [26]. The α -terthienyl preferentially attacks the cell membranes of nuclear envelopes and mitochondria [27].

To investigate whether the antileishmanial effect of thiophene derivatives is induced by damaging the plasma membrane or by affecting cell physiology, the promastigote forms were incubated with isolated compounds and propidium iodide (PI). When we treated promastigote forms with compounds **A** and **B** and propidium iodete, both compounds did not exhibit flow cytometric changes. The results showed that even under high concentrations of compounds **A** and **B**, the results were negative, ie, the compounds did not act on the cellular membrane of the parasite.

Detection of internal PI in promastigote forms of *L. amazonensis* was analyzed by FACScan analysis. The results showed that untreated normal cells and treated cells with concentrations of 50 at 500 $\mu\text{g/ml}$ of thiophene derivatives showed no signal with respect to the fluorescence activity of PI. Since PI is unable to cross intact cell membranes, it can only bind to intracellular RNA and DNA, and fluoresce when

the cell membrane has been disrupted. Therefore, in suspensions of live cells, fluorescence of PI can be an accurate signal of the moment the cell membrane is breached and, by inference, cell death occurs. This gives an accurate depiction of the dynamics of drug action on the trypanosome [28].

Amphotericin B was used as positive control for the marker propidium iodide. The mechanism of action of amphotericin B results from its binding to ergosterol resulting in change membrane permeability and osmotic balance of parasite [29-31].

Conclusion

The compounds **A** and **B** significantly reduced the survival and/or multiplication of intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, showed low toxicity for human cells and induced changes in the morphology of the promastigote forms. Compound **A** showed alteration on mitochondrial membrane, detected by flow cytometry which was confirmed by transmission electron microscopy. Compound **B** caused no change in the cell and mitochondrial membrane. The mechanism of action of the thiophene derivatives is still unclear. Both compounds must be submitted to further studies and may have a role in the development of new drugs for leishmaniasis chemotherapy.

Acknowledgements

This study was supported through grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/Fundação Araucária), Complexo de Central de Apoio a Pesquisa (COMCAP) – UEM, and Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

References

- [1] Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996;14:417–23.
- [2] WHO Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. World Health Organisation, <http://www.who.int/emc/documents/surveillance/docs/whocdscsrisr2001.html>/Leishmaniasis/Leishmaniasis.htm
- [3] Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006;22: 552–57.
- [4] Lainson, R., Shaw, J.J., 2005. In: Cox, F.E.G., Kreier, J.P., Wakelin, D., editors. New World Leishmaniasis. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Hodder, p. 313–49.
- [5] Yardley V, Khan AA, Martin MB, Slifer TR, Araujo FG, Moreno SNJ, Docampo R, Croft SL, Oldfield E. *In vivo* activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:929–31.

- [6] Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10:307–15.
- [7] Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travels. *Int J Infect Dis* 2010;14:1032-39.
- [8] Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura, CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* 2011;15:525-32.
- [9] Jorge AS, Silveira TGV, Lonardoni, MVC, Arraes SMAA, Zanzarini PD, Silva CM, Mello JCP, Bertolini DA. Crude extract of “cravinho” [*Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.] show activity against *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:298.
- [10] Badillo V. Lista atualizada de las species de la familia *Compuestas* (Asteraceae) de Venezuela. *Ernstia* 2001;11:191.
- [11] Kissman KG, Groth D, editors. Plantas infestantes e nocivas. 2th ed. São Paulo: BASF; 1997. 978p.
- [12] Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, parasitas, aquáticas e tóxicas. 3th ed. Nova Odessa: Plantarum; 2000. 640p.
- [13] Takahashi HT, Novello CR, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Mello JCP, Nakamura CV. Thiophene derivatives with antileishmanial activity Isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules* 2011;16:3469-78.
- [14] Conceição K, Konno K, Richardson M, Antoniazzi MM, Jared C, Daffre S, Camargo ACM, Pimenta DC. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 2006;27:3092–9.
- [15] Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, Andrade Jr. HF, Antoniazzi MM, Jared C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of

- bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon* 2008;52:13–21.
- [16] Chang KP. Human cutaneous Leishmania in mouse macrophage line: Propagation and isolation of intracellular parasite. *Science* 1980;209:1240-42.
- [17] Kubba R, Al-Gindan Y, El-Hassan AM, Omer AH. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis (Oriental sore). *J Am Acad Dermatol* 1987;16:1183-89.
- [18] Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Antileishmanial activity of two γ -pyrones from *Podolepsis hieracioides* (Asteraceae). *Acta Trop* 2003;86:105-7.
- [19] Tiuman TS, Nakamura TU, Cortez DAG, Dias Filho BP, Diaz JAM, De Souza V, Nakamura CV. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 176-82.
- [20] Silva-Filho AA, Resende DO, Fukui MJ, Santos FF, Pauletti PM, Cunha WR, Silva MLA, Gregório LE, Bastos JK, Nanayakkara NPD. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae) *Fitoterapia* 2009;80:478–82.
- [21] Gandhi VM, Cherian KM. Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicol in Vitro* 2000;14:513-6.
- [22] Rodrigues JCF, Souza W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. *Curr Pharm Des* 2008;14:925-38.
- [23] Van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:967-71.

- [24] Hu L, Arafa RD, Ismail MA, Wenzler T, Brun R, Munde M, Wilson WD, Nzimiro S, Samyesudhas S, Werbovetz KA, Boykin W, Azaterphenyl diamidines as antileishmanial agents; Bioorg Med Chem Lett 2008;18:247-51.
- [25] Santa-Rita RM, Henrique-Pons A, Barbosa HS, Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. J Antimicrob Chemother 2004;54:704-10.
- [26] Mares D, Romagnoli C, Rossi R, Carpita A, Ciofalo M, Bruni A. Antifungal activity of some 2,2':5',2"-terthiophene derivatives. Mycoses 1994;37:377-83.
- [27] Hudson JB, Graham EA, Rossi R, Carpita A, Neri D, Towers GHN. Biological activities of terthiophenes and polyyne from the Asteraceae. Planta Med 1993; 447-50.
- [28] Gould MK, Vu XL, Seebeck T, Koning HP. Propidium iodide-based methods for monitoring drug action in the kinetoplastidae: Comparison with the Alamar Blue assay. Anal Biochem 2008;382:87–93.
- [29] Saha AK, J, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. Mol Biochem Parasitol 1986;19:195-200.
- [30] Olliaro PL, Bryceson ADM. Pratical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. Parasitol Today 1993;9:323-8.
- [31] Turbina J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology 1997;114:91-9.

Figures

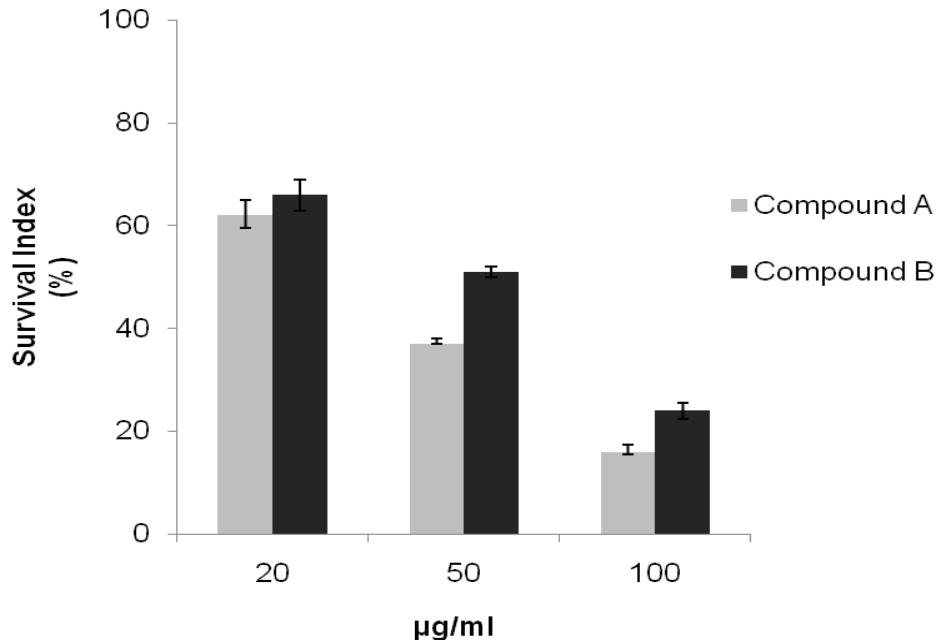


Figure 1- Effect of *thiophene* derivatives on intracellular amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Peritoneal macrophage cells were infected with promastigotes and then treated with 20, 50, and 100 µg/ml of compounds **A** and **B**. Each bar represents the mean ± standard error of at least two independent experiments, which were performed in duplicate.

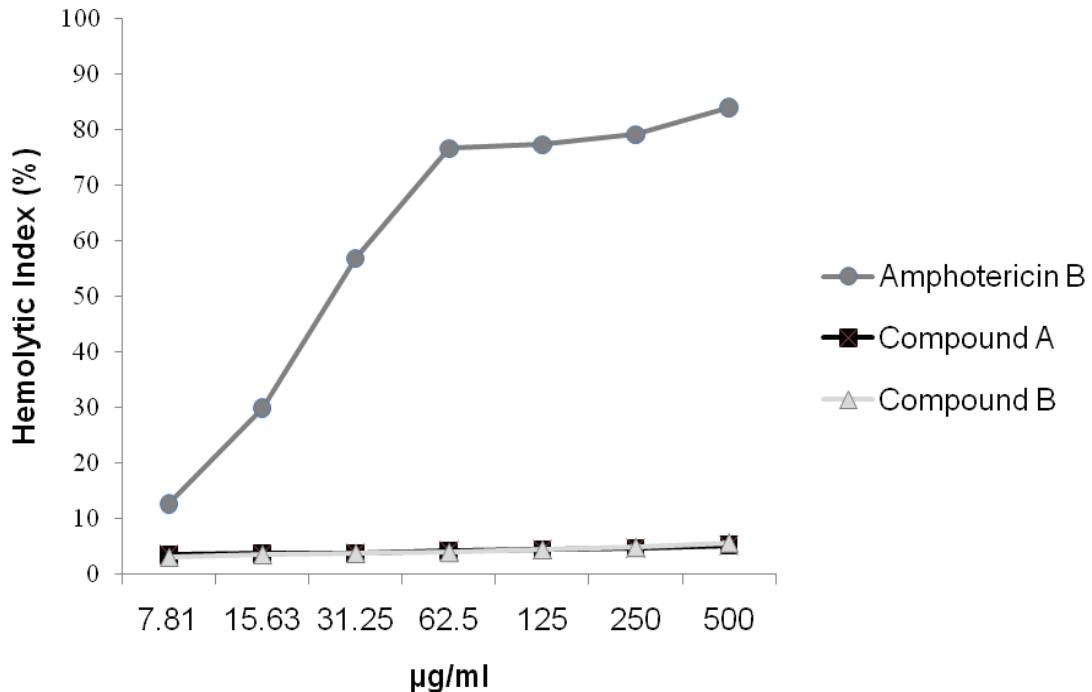


Figure 2- Hemolitic properties of thiophene derivatives on human erythrocyte cells treated with compounds **A**, **B**, or amphotericin B

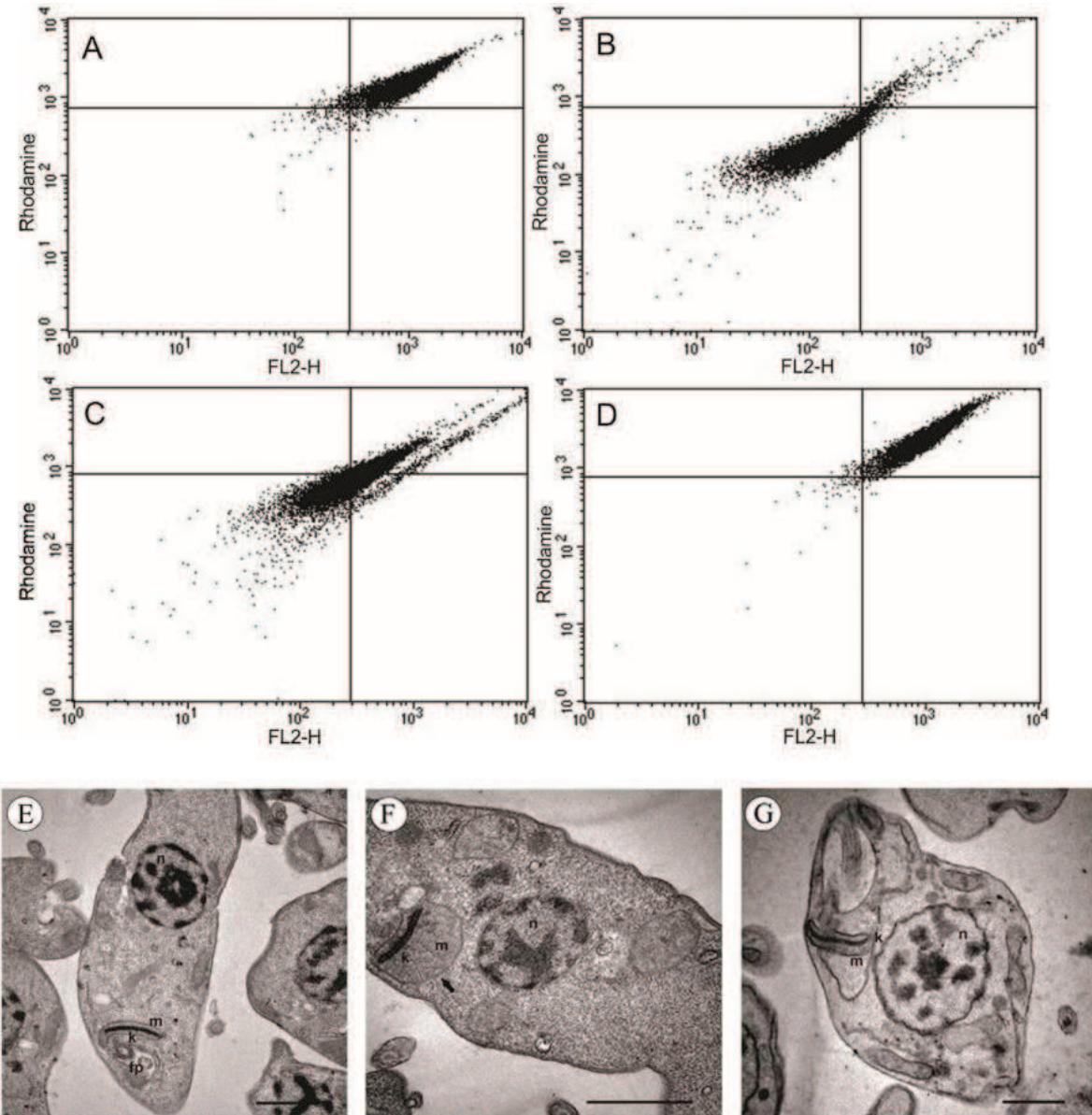


Figure 3- Flow cytometry analysis of *L. amazonensis* promastigotes treated with compound **A** and **B** stained with rhodamine 123 (A) Untreated cells; (B) Positive control (CCCP); (C) Promastigotes treated with 400 µg/ml of compound **A**; (D) Parasites treated with 300 µg/ml of compound **B** and Transmission electron micrographs on promastigote forms of *L. amazonensis* (E) Untreated cells; (F) Promastigotes treated with IC₅₀ value of compound **A**; (G) Promastigotes treated with IC₉₀ value of compound **A**. Bars=1µm

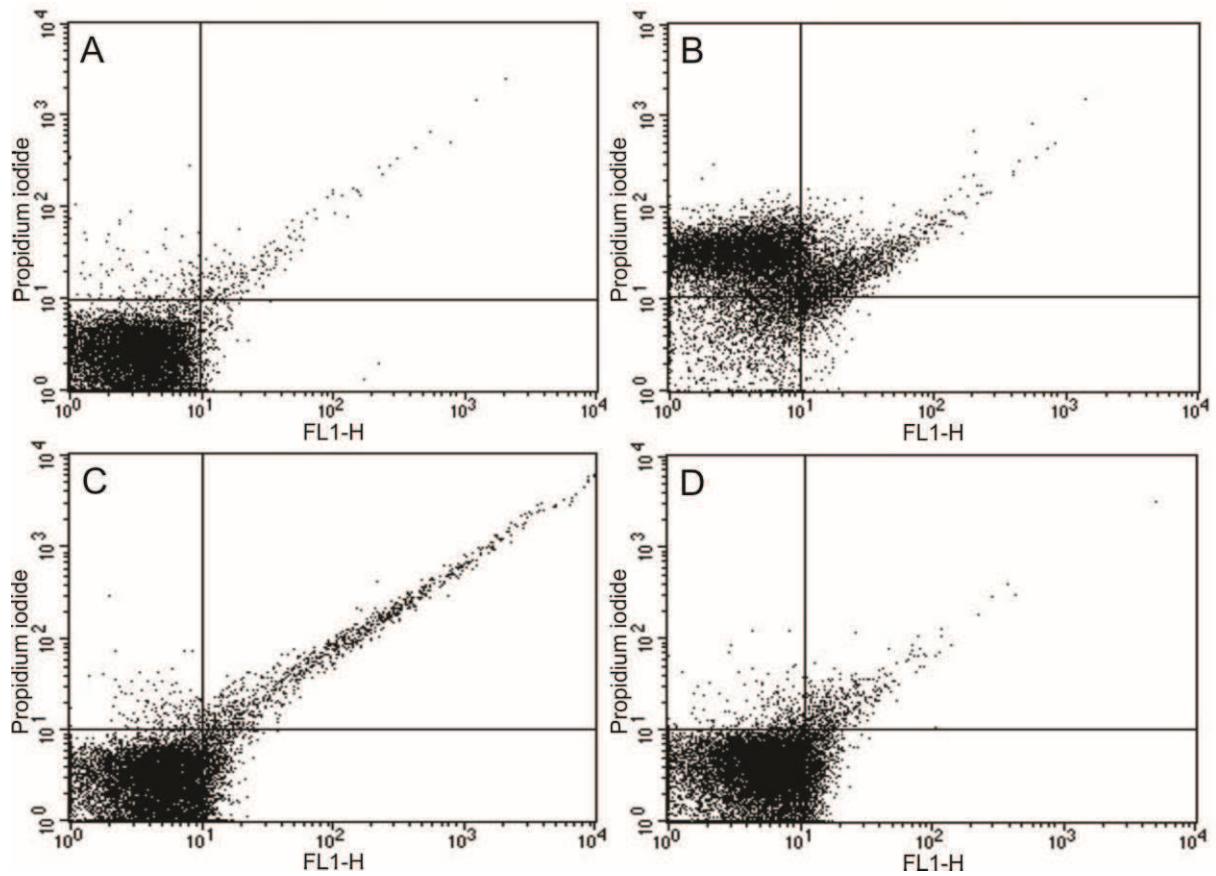


Figure 4- Flow cytometry of *L. amazonensis* promastigotes treated with compounds **A** and **B** stained with propidium iodide (A) Untreated cell; (B) Positive control (amphotericin B); (C) Promastigotes treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of compound **A**; (D) Parasites treated with 400 $\mu\text{g/ml}$ of compound **B**.

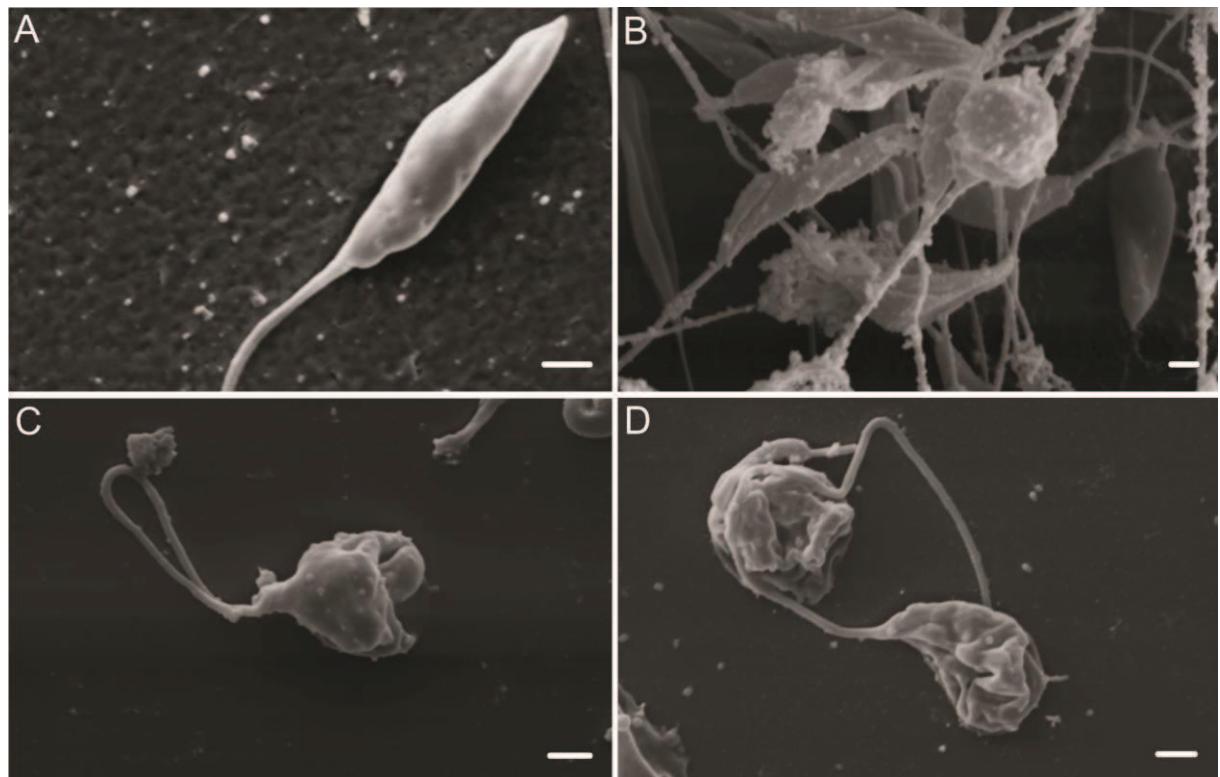


Figure 5 - Scanning electron microscopy of promastigotes of *L. amazonensis* treated with compounds **A** and **B** after incubation for 72 h at 25 °C. a) Control - promastigote forms untreated; b) parasites treated with IC₉₀ of compound **A**; c) parasites treated with IC₅₀ of compound **B**; d) parasites treated with IC₉₀ of compound **B**. Bars=1 µm

7. CONCLUSÕES

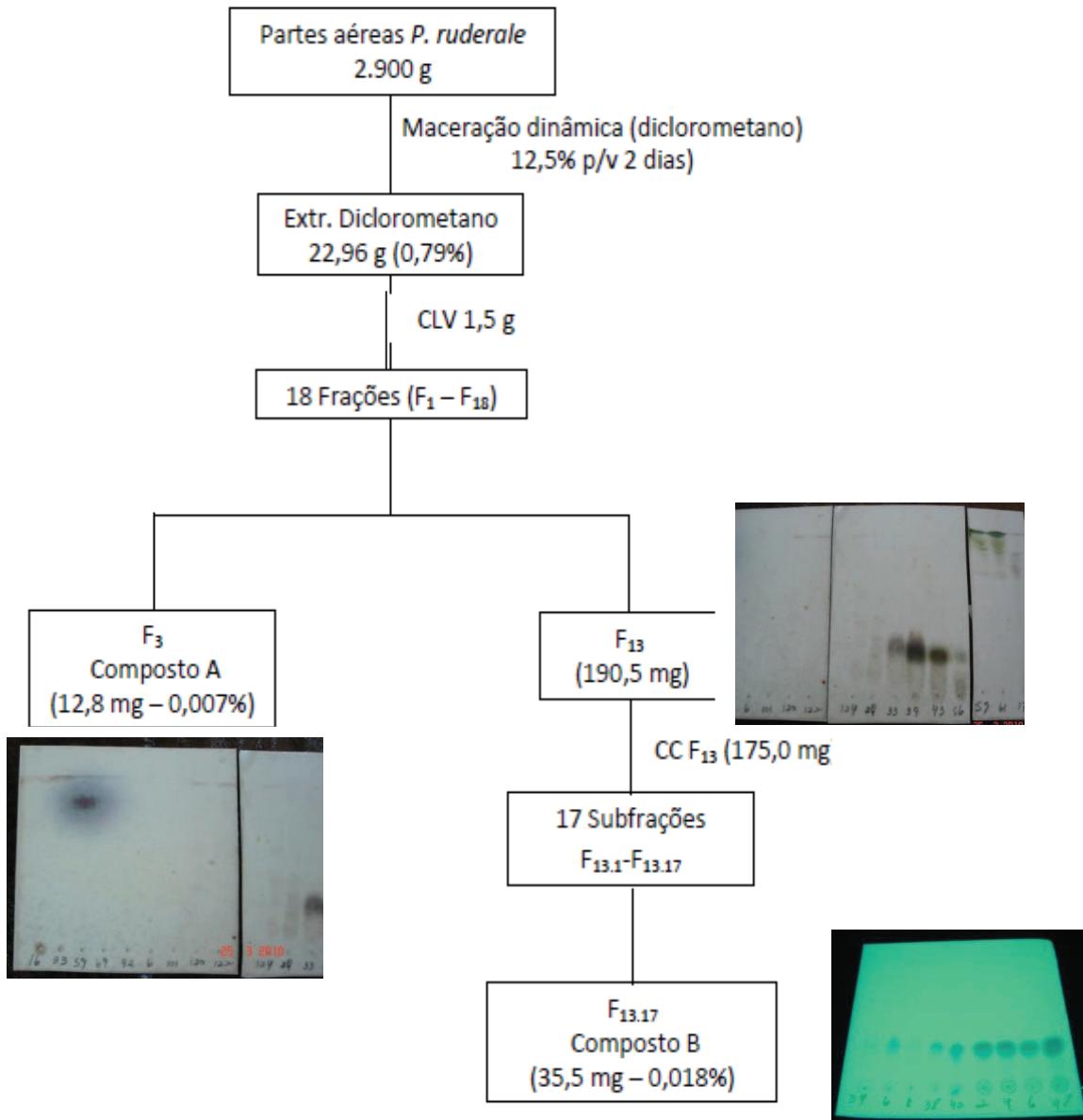
- Foram isoladas duas substâncias bioativas do extrato diclorometano de partes aéreas de *P. ruderale*: 5-metil-2,2':5',2''-tertifeno (composto **A**) e 5'-metil-[5-(4-acetóxi-1-butinil)]-2,2'bi-tiofeno (composto **B**);
- O composto A apresentou uma maior atividade ($Cl_{50} = 7,7 \pm 1,7$ e $19,0 \pm 4,7$ $\mu\text{g/mL}$) do que o composto B ($IC_{50} = 21,3 \pm 4,4$ e $28,7 \pm 2,6$ $\mu\text{g/mL}$) e o extrato bruto ($60,3 \pm 9,2$ e $77,7 \pm 7,7$ $\mu\text{g/mL}$), respectivamente, sobre as formas promastigota e amastigota axênica de *L. amazonensis*;
- O composto A apresentou uma maior atividade ($Cl_{50} = 37 \pm 0,0$ $\mu\text{g/mL}$) do que o composto B ($Cl_{50} = 51 \pm 0,0$ $\mu\text{g/mL}$) sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
- O composto A apresentou uma menor citotoxicidade ($CC_{50} = 370 \pm 50$ $\mu\text{g/mL}$) do que o composto B ($CC_{50} = 335 \pm 15$ $\mu\text{g/mL}$) sobre macrófagos J774G₈;
- O composto A apresentou valores de índice de seletividade (IS) maiores do que o composto B (48,2 contra 15,7) em relação às formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- O composto A apresentou valores de IS maiores do que o composto B (19,1 contra 11,7) em relação às formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*;
- Os compostos A e B apresentaram índices hemolíticos menores do que 10%, mesmo sob uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, empregando-se a mesma concentração, a anfotericina B, apresentou índice hemolítico de 84%;
- O tratamento de formas promastigotas de *L. amazonensis* com os compostos A ou B induziram alterações morfológicas (células arredondadas e inchadas) quando visualizadas sob microscopia de varredura;

- Após o tratamento de células de *L. amazonensis* com o composto A, a citometria de fluxo indicou alteração na membrana mitocondrial, o que também foi evidenciada pela microscopia de transmissão;
- Após o tratamento de células de *L. amazonensis* com o composto B, a citometria de fluxo não indicou alteração em membrana mitocondrial e membrana citoplasmática; por sua vez, a microscopia de transmissão também não indicou alterações;
- O mecanismo de ação dos derivados tiofênicos isolados de partes aéreas de *P. ruderale* ainda não está esclarecido. Para isso, ambas substâncias devem ser submetidas a outros testes *in vitro*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dois derivados tiofênicos isolados de *P. ruderale* apresentaram uma atividade interessante contra as formas promastigota, amastigota axênica e amastigota intracelular de *L. amazonensis*. Ambas substâncias poderão ser empregadas na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses. Para isso, deverão ser elucidados os mecanismos de ação, preparada e desenvolvida uma formulação farmacêutica, de preferência através do uso da moderna tecnologia envolvendo novos sistemas de transporte de fármacos e realização de ensaios pré-clínicos e clínicos, ou seja, teste de segurança e eficácia em animais e humanos, respectivamente.

APÊNDICE A – Fluxograma de Extração, Isolamento e Identificação de Substâncias Antileishmania de *P. ruderale*



APÊNDICE B - Dados Espectroscópicos das Substâncias Isoladas

As substâncias 5-metil-2,2':5',2''-tertiofeno e 5'-metil-[5-(4-acetóxi-1-butinil)]-2,2'bi-tiofeno foram analisadas a 300 MHz, diluído em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e obtidos os seguintes espectros:

- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H ;
- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C .

