

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FABIANA BORGES PADILHA FERREIRA

Atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de
Tetradenia riparia (Hochstetter) Codd

MARINGÁ
2016

FABIANA BORGES PADILHA FERREIRA

Atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de
Tetradenia riparia (Hochstetter) Codd

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

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Valdrinez Campana Lonardoni

MARINGÁ
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

FABIANA BORGES PADILHA FERREIRA

Atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de
Tetradenia riparia (Hochstetter) Codd

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Zilda Cristiani Gazim
Universidade Paranaense

Sandra Mara Alessi Aristides
Universidade Estadual de Maringá

Izabel Galhardo Demarchi
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 29 de fevereiro de 2016

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, campus da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu marido, amigo e companheiro Gilberto Alves Ferreira meu grande incentivador nesta jornada; sem você não teria conseguido!

As minhas filhas Yasmin Padilha Ferreira e Isabella Padilha Ferreira, presente de Deus, amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, força para superar as dificuldades e determinação para a realização deste sonho. Por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais nestes dois anos.

Aos amores da minha vida, meu marido e minhas filhas, por toda paciência, compreensão, amor, carinho e por aguentarem meus momentos de ansiedade e estresse.

Aos meus pais Vanda Borges Padilha e Benedito Silvério Padilha por todo apoio, confiança e por estarem sempre ao meu lado nos momentos que mais precisei.

A minha orientadora professora Maria Valdrinez Campana Lonardoni pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência, compreensão nos momentos difíceis, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para meu crescimento profissional. Seu amor à profissão, à pesquisa e seu profissionalismo muito me inspira.

A prof^a Dr^a Izabel Galhardo Demarchi pelos ensinamentos, orientações, incentivo, amizade e dedicação. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

As prof^{as} Dr^{as} Thais Gomes Verzignassi Silveira e Sandra Mara Alessi Aristides que sempre se mostraram dispostas em me auxiliar quando tive dúvidas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelo conhecimento científico e profissional que me foram acrescentados no decorrer das disciplinas.

A Olívia Abeche da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por toda a paciência, atenção, competência, sempre disposta a nos ajudar de uma forma muito carinhosa.

A Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera por toda sua ajuda na parte experimental deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Imunologia Clínica que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, especialmente: Marinete Martinez Vicentim, Karin R. R. de Castro, Jully Oyama, Taisa Rocha Navasconi e Mateus Vailant Thomazella.

EPÍGRAFE

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”.

Anatole France

Atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, de caráter zoonótico e endêmica em 98 países. A transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. A leishmaniose tegumentar americana é uma das afecções dermatológicas de grande importância devido a sua capacidade de formar deformações e também pelo envolvimento psicológico e social. O parasito *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas: a forma promastigota, flagelada, que se encontra no tubo digestório dos insetos vetores e a forma amastigota, aflagelada que se desenvolve intracelularmente nas células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado. O tratamento da leishmaniose tem apresentado falhas terapêuticas e graves efeitos adversos, o que tem levado à busca por novos agentes antiparasitários com maior efetividade e menor toxicidade. Assim, neste estudo foi avaliado o efeito do extrato bruto e frações isoladas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, citototoxicidade sobre eritrócitos humanos e macrófagos J774.A1. Os resultados obtidos sugerem que o extrato bruto e as frações isoladas de *T. riparia* possuem atividade leishmanicida, apresentando ausência de toxicidade para eritrócitos humanos, apesar da toxicidade sobre macrófagos J774.A1, podendo ser uma alternativa promissora no tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Citotoxicidade, extrato bruto, frações, Lamiaceae, *Leishmania*, mirra.

Leishmanicidal activity of the crude extract and fractions obtained from the leaves of *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease, not contagious, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, zoonotic and endemic character in 98 countries. The transmission occurs through sandfly bite *Lutzomya* genus. Leishmaniasis is one of the dermatologic diseases of great importance due to their ability to form deformations and also the psychological and social involvement. The *Leishmania* parasite has two evolutionary forms: the promastigote form, flagellate, which is in the digestive tract of the insect vector, and the amastigote form, aflagellate that develops intracellularly in mononuclear phagocytic cells of the vertebrate host. Treatment of leishmaniasis has shown therapeutic failures and severe adverse effects, which has led to the search for new antiparasitic agents with greater efficacy and lower toxicity. This study evaluated the effect of the crude extract and isolated fractions of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd on promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cytotoxicity human erythrocytes and J774.A1 macrophages. The results suggest that the crude extract and the fractions isolated *T. riparia* have leishmanicidal activity, with no toxicity to human erythrocytes, despite the toxicity J774.A1 macrophages, may be a promising alternative in the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Cytotoxicity, crude extract, fractions, Lamiaceae, *Leishmania*, mirra.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 1 Formas Clínicas de leishmaniose tegumentar..... | 13 |
| Figura 2 Esquema de classificação taxonômica da <i>Leishmania</i> | 14 |
| Figura 3 Ciclo biológico <i>Leishmania</i> spp. | 15 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Efeito leishmanicida e citotoxicidade do extrato bruto e das frações isoladas de <i>T. riparia</i> | 46 |
| Figura 1 Porcentagem de mortalidade das formas promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> em 24, 48 e 72h de incubação com extrato bruto e frações <i>T. riparia</i> | 47 |
| Figura 2 Porcentagem de hemólise em eritrócitos tratados com as frações e extrato bruto de <i>T. riparia</i> | 48 |

Artigo elaborado e formatado conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (artigo 1) disponível em: <http://www.abc.org.br/article.php3?id_article=100>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Leishmaniose tegumentar americana..... | 13 |
| Parasito..... | 13 |
| Os vetores..... | 15 |
| Epidemiologia..... | 15 |
| Diagnóstico..... | 16 |
| Tratamento..... | 16 |
| <i>Tetradenia riparia</i> | 17 |
| Justificativa..... | 18 |
| Objetivos..... | 19 |
| Referências..... | 19 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Artigo 1: Atividade leishmanicida das frações obtidas do extrato bruto das folhas de <i>Tetradenia riparia</i> (Hochstetter) Codd..... | 25 |
|--|----|

CAPÍTULO III

| | |
|---------------------------|----|
| Conclusões..... | 49 |
| Perspectivas Futuras..... | 50 |

CAPÍTULO I

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (REIS et al., 2012). Dependendo da espécie, do parasito envolvido e a relação parasito-hospedeiro pode se manifestar em diferentes formas clínicas (SARAVIA et al., 1989) (Figura 1). Apesar da ampla variedade de formas clínicas encontradas, a LTA pode ser dividida em três tipos: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (LIMA et al., 2012). A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, insetos do gênero *Lutzomyia* (BASANO E CAMARGO, 2004), infectadas por *Leishmania* (SILVA, 2012). O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (BRASIL, 2010). No Brasil a LTA é uma das afecções dermatológicas mais importantes devido a sua magnitude, capacidade de produzir deformidades e também pelo envolvimento psicológico e social (OLIVEIRA, 2014).



Figura 1. Formas clínicas de leishmaniose tegumentar: a) leishmaniose cutânea; b) leishmaniose cutânea difusa; c) leishmaniose cutaneomucosa
Fonte: a) ARAÚJO, 2014; b) ZERPA e CONVIT, 2009; c) SANTOS et al., 2013.

O PARASITO

Os parasitas do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae (Figura 2) (LEVINE et al., 1980) e nas Américas são reconhecidas onze espécies causadoras da doença humana e oito espécies em animais (BRASIL, 2010). Um grande número de espécies de mamíferos são reservatórios naturais de *Leishmania*, como os cães domésticos e selvagens, as

do flebotomíneo, diferenciando-se, em promastigota metacíclica. Na necessidade de alimentar-se, o flebotomíneo faz novo repasto sanguíneo, injetando assim, as formas infectivas, reiniciando o ciclo (NEVES, 2005).

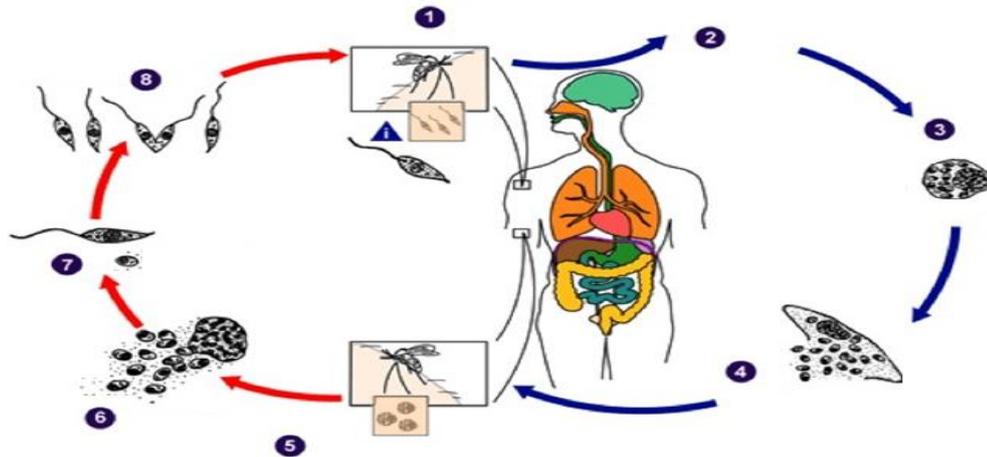


Figura 3. Ciclo biológico *Leishmania* spp. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2010 (adaptado). www.dpd.cdc.gov

OS VETORES

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos (Ordem: *Diptera*, Família: *Psychodidae*, Subfamília: *Phlebotominae*), dos gêneros *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* no velho mundo (BRASIL, 2006; REY, 2001).

Os flebotomíneos são insetos tipicamente de matas, porém, devido às alterações ambientais, naturais ou resultantes de ações antrópicas, os habitats desses insetos estão em constante modificações (XIMENES et al. 2007). As espécies de alguma forma, resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes e se aproximam cada vez mais dos peridomicílios (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994).

EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países, incluindo principalmente países das Américas do Sul e Central, África e Ásia. Não existem estimativas precisas da sua real incidência devido a vários fatores: subnotificação de dados, numerosos diagnósticos diferenciais existentes, infecções assintomáticas e variações na resposta do hospedeiro e dos agentes etiológicos envolvidos (ALVAR et al., 2013).

A estimativa da doença é de 1,3 milhões de novos casos, com letalidade entre 20.000 e 30.000 pessoas por ano. Deste total mundial, cerca de 0,2 a 0,4 milhão dos novos casos são de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,3 milhões são de leishmaniose tegumentar. De 70-75% dos casos ocorrem principalmente em dez países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (WHO, 2015). A LTA é amplamente distribuída no território brasileiro, ocorrendo em todas as regiões do país (ARRUDA, 2009).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LTA é realizado com base em critérios epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e, em muitas vezes uma combinação destes é necessário para chegar ao diagnóstico final (SKRABA et al., 2014).

A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial constitui-se fundamentalmente de três grupos de exames: parasitológico (histopatologia, pesquisa direta do parasito e cultura), imunológicos (western blot, intradermorreação de Montenegro-IDRM, ensaio imunoenzimático-ELISA, imunofluorescência indireta-IFI, citometria) e moleculares (reação em cadeia de polimerase-PCR) (BRASIL, 2010).

TRATAMENTO

Para o tratamento convencional da LTA são utilizadas drogas que possuem limitações importantes quanto à segurança de uso, apresentando toxicidade relevante e uma alta frequência de efeitos colaterais (OLIVEIRA et al., 2011). Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para o tratamento da LTA, existindo sob duas formas: o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®). Este último não é comercializado no Brasil (ALMEIDA e SANTOS, 2011). São consideradas drogas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania* (BRASIL, 2014). Quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso, são utilizadas drogas de segunda escolha, como as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) ou anfotericina B (GONTIJO e CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007). Tanto as pentamidinas quanto a anfotericina B apresentam alta toxicidade e custo elevado (OLIVEIRA et al., 2013).

Terapias alternativas têm sido pesquisadas, tais como a utilização de imunoterapia e a terapia fotodinâmica (TFD) que está emergindo como opção de tratamento local com excelentes resultados (AMEEN, 2010). Diversos fármacos tem sido testados, como a pentoxifilina

associada ao antimônio pentavalente para o tratamento de pacientes com leishmaniose mucosa grave e refratária ao tratamento convencional (ALMEIDA e SANTOS, 2011).

Várias dificuldades são encontradas para o tratamento da leishmaniose como alto custo do tratamento, dificuldade de administração (as drogas são usualmente injetáveis) e sua toxicidade. Frequentemente são encontrados parasitos resistentes, e o longo período de tratamento, tornam urgente a necessidade de drogas alternativas, esquemas terapêuticos mais curtos, acessíveis e baratos (DE PAULA et al., 2003). Com essa necessidade, o uso de plantas medicinais no tratamento da leishmaniose, vem oferecendo novas perspectivas para a descoberta de novos compostos diferenciados e com propriedades terapêuticas (Meneguetti et al., 2015).

Tetradenia riparia

O gênero *Tetradenia* compreende 59 espécies de plantas, dentre elas a *Tetradenia riparia*, encontrada na África do Sul, Etiópia, Angola e Namíbia. A *T. riparia* (Hochst.) Codd pertence à família Lamiaceae, é um arbusto de 1-3 m de altura, de origem africana, que prefere locais rochosos, mas se reproduz bem em locais úmidos e de baixas altitudes (PHILLIPSON e STEYN, 2008). É empregada na medicina popular em Rwanda (África Central) onde é conhecida popularmente como umuravumba (MARTINS et al., 2008). Suas folhas são utilizadas para doenças como malária, angina, doença tropical de pele, gastroenterites, gonorréia, diarreia, abscessos dentários, dores de cabeça, bronquites, tosses, úlceras, esterilidade feminina, doenças renais, febres e outras (VAN PUYVELDE et al.1981; VAN PUYVELDE et al.1986). No Brasil, essa espécie é denominada incenso, lavândula, limonete, ou falsa mirra (Figura 4) (MARTINS et al., 2008). Esta planta está bem aclimatada no Brasil, onde é utilizada como uma planta ornamental.

Há décadas a mirra é alvo de pesquisas com o objetivo de se isolar e identificar constituintes químicos presentes nos extratos e óleo essencial obtidos das folhas desta planta. Zelnik et al., (1978) isolaram o ibozol e o 7 α -hidroxiroileanona; Van Puyvelde et al., (1981), isolaram o 1', 2' -Dideacetilboronolida. Estudos mostraram que tanto o extrato bruto como o óleo essencial extraído das folhas de *T. riparia* tem atividade antimicrobiana (VAN PUYVELDE et al., 1986), antiespasmódica (VAN PUYVELD et al., 1987), larvicida (WEAVER et al., 1992), inseticida (WEAVER et al., 1994), antimalarial (CAMPBELL et al., 1997), ação repelente comparado a um repelente sintético (OMOLO et al., 2004).

Compreender os efeitos biológicos dos extratos de plantas medicinais e seus metabólitos é uma excelente estratégia na busca de novos medicamentos com atividade

potencial e menor toxicidade para o tratamento de diversas doenças, incluindo leishmaniose (CARRARA et al., 2013; MOREIRA et al., 2013).

Devido a necessidade de novos tratamentos com menor toxicidade, maior seletividade e mais acessíveis muitos estudos buscam produtos naturais novos e ativos (SEN e CHATTERJEE, 2011). Em vista desta necessidade, o presente estudo visa determinar a atividade leishmanicida do extrato bruto e de frações isoladas das folhas de *T. riparia* (Hoschst.) Codd. que possam contribuir para o tratamento da LTA.

JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença endêmica e sua importância se dá pela elevada incidência e ampla distribuição, além das implicações econômicas, transformando-se em um sério problema sanitário e econômico-social. Apesar disso, os dados publicados sobre o uso de novas drogas para o tratamento em nosso meio ainda são bastante limitados.

O tratamento convencional das leishmanioses é realizado com drogas de alta toxicidade, de custo elevado, difícil administração e que podem causar resistência ao parasito e o abandono ao tratamento (BLUM e HATZ, 2009). Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas opções terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos (DE CARVALHO e FERREIRA, 2001).

A indústria farmacêutica tem pouco interesse quanto ao tratamento da LTA e assim, os estudos com as plantas medicinais com remédios populares têm contribuído para a formulação de novos compostos farmacêuticos. Os produtos com atividade anti-*Leishmania* e que estimulam a resposta imune celular protetora e regulam a imunidade, podem ser uma alternativa para os casos de resistência terapêutica, falhas ou efeitos adversos (SEN e CHATTERJEE, 2011).

A *T. riparia* tem sido alvo de pesquisas no Brasil, demonstrando-se suas atividades leishmanicida (CARDOSO et al., 2015; DEMARCHI et al., 2015a), imunomoduladora (DEMARCHI, et al., 2015b), antimicrobiana (MELO et al., 2015; COSTA et al., 2015; MARTINS et al., 2008), antifúngica (ENDO et al., 2015), antioxidante (GAZIM et al., 2014), antimicrobiana e analgésica (GAZIM et al., 2010), acaricida e larvicida sobre o carrapato bovino (GAZIM et al., 2011) e sobre *Schistosoma mansoni* (DE MELO et al., 2015).

Até o momento este é o primeiro relato de um estudo sobre a atividade leishmanicida do extrato bruto e frações de *T. riparia* (Hoschst.) Codd. Os resultados indicaram uma

alternativa promissora, o que justifica estudos para substituir os produtos químicos atualmente empregados no tratamento da leishmaniose.

OBJETIVOS

GERAL

- Estudar a atividade leishmanicida do extrato bruto e de frações isoladas de *Tetradenia riparia* para formas promastigotas do protozoário *L. (L.) amazonensis*.

ESPECÍFICOS

- Preparar e padronizar o extrato bruto de *T. riparia*.
- Obter as frações do extrato de *T. riparia*.
- Estudar a atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *T. riparia* para formas promastigotas.
- Avaliar o efeito citotóxico em hemácias humanas e em macrófagos da linhagem J774.A1.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.

ALVAR, J.; CROFT, S. L.; KAYE, P.; KHAMESIPOUR, A.; SUNDAR, S.; REED, S. G. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, p. B244-B249, 2013.

ARAÚJO, A. R. Fatores de risco associados à leishmaniose tegumentar americana em área endêmica do estado de Pernambuco, Brasil. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, 2014, 90f.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ARRUDA, M. M. Leishmanioses. In: Programa de zoonoses Região Sul: manual de zoonoses. Curitiba: Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, Conselho Regional de Medicina Veterinária de Santa Catarina, Conselho Regional de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, 68 p., 2009.

- BASANO, A. S.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n.3, p. 328-337, 2004.
- BLUM, J.; HATZ, C. F. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of Travel Medicine**, v. 16, p. 123-31, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. –Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- CAMPBELL, W. E.; GAMMON, D. W.; SMITH, P., ABRAHAMS, M.; PURVES, T. D. Composition and antimalarial activity *in vitro* of the essential oil of *Tetradenia riparia*. **Planta Médica**, v. 63, p. 270-272, 1997.
- CARDOSO et al. Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n.8, p. 1024-1034, 2015.
- CARRARA, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; CORRÊA, A. G.; CASTRO, M. C. A. B. Estudo do papel de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana. Tese. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2013.
- COSTA, G. M.; ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v.4, n.6, p. 908-917, 2015.
- DE CARVALHO, P.B; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599-618, 2001.
- DE MELO, N. I.; MANTOVANI, ANDRÉ L. L.; OLIVEIRA, P. F.; GROPPPO, M.; SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C.; MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M. Antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Lamiaceae). **Natural Product Communications**, v. 10, n. 9, p. 1627-1630, 2015.

DE PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.3, p. 365-371, 2003.

DEMARCHI, I. G.; THOMAZELLA, M. V.; TERRON, M. S.; LOPES, L.; GAZIM, Z. C.; CORTEZ, D. A. G.; DONATTI, L.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 128-137, 2015a.

DEMARCHI IG, TERRON MS, LOPES L, THOMAZELLA MV, PEDROSO RB, GAZIM ZC, CORTEZ D AG, ARISTIDES SMA, SILVEIRA TGV, LONARDONI MVC. Immunomodulatory activity of essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. in murine macrophages. **Flavour Fragrance Journal**, 38: 64-77, 2015b.

ENDO, E.H.; COSTA, G.M.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Antidermatophytic activity of hydroalcoholic extracts from *Rosmarinus officinalis* and *Tetradenia riparia*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 4, p. 274-279, 2015.

GAZIM et al. New natural diterpene-type abietane from *Tetradenia riparia* essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. **Molecules**, v. 19, 514-524, 2014.

GAZIM, Z. C.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.; AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; FERREIRA, G. A.; LIMA, E. L.; COSMO, F. A.; CORTEZ, D. A. G. Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari; Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 175–178, 2011.

GAZIM, Z. C.; AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; NASCIMENTO, I. A. N.; FERREIRA, G. A.; CORTEZ, D. A. G. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 5509-5524, 2010.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, v. 7, p. 37-58, 1980.

LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E. V. *In Vitro* Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual Química**, v.4, n. 6, p. 692-702, 2012.

MARTINS, M. B. G.; MARTINS, R. G.; CAVALHEIRO, J. A. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*). **Revista Biociências**, v. 14, p. 127-140, 2008.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 359-375, 1994.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **The Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 107, p. 7-14, 2013.

MELO, N. I.; CARVALHO, C. E.; FRACAROLLI, L.; CUNHA, W. R., VENEZIANI, R. C. S.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p.519-525, 2015.

MENEGUETTI DUO, LIMA RA, MACEDO SRA, BARROS NB, FACUNDO JB, MILITÃO JSLT, NICOLETE R, FACUNDO VA. Plantas da Amazônia brasileira com potencial leishmanicida *in vitro*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, p.359-374, 2015.

MOREIRA, V. R.; DIAS, A. C. S.; MARTINS, A. R. P.; LIMA, M. I. S.; SERRA, I. C. P. B.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; PEREIRA, S. R. F. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of antileishmanial extract from *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 1132-1142, 2013.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. Ed. 11. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, 493p.

OLIVEIRA, D. A. S.; FIGUEIREDO, M. F.; BRAGA, P. E. T. Perfil Epidemiológico dos Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana na Serra da Meruoca, Ceará, no Período de 2001 a 2012. **SANARE**, Sobral, v. 13, n.2, p. 36-41, 2014.

OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; VILLAS BÔAS, G. K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, vol. 8, n. 1, p. 1-72, 2013.

OLIVEIRA, L. F. O.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. O.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, p. 87-96, 2011.

OMOLO, M. O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I. O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2797-2802, 2004.

PHILLIPSON, P. B.; STEYN C. F. *Tetradenia* (Lamiaceae) in Africa: new species and new combinations. **Adansonia**, 30: 177-196, 2008.

REIS, A. S.; RIOS, C. E. P.; MELO, L. P.; COSTA, G. C.; SILVA, L. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; AMARAL, F. M. M.; NASCIMENTO, F. M. M. Atividade leishmanicida *in vitro* de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Ciência Saúde**, v. 14, p. 119-126, 2012.

REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856p.

SANTOS, M. E. S. M.; NOGUEIRA, E. F. C.; LOPES, P. H. S.; TORRESI, B. C. A. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico e tratamento. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.**, v.13, n.2, p. 15-20, 2013.

SARAVIA, N. G. L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A. F.; HOLGUÍN, C.; NAVAS, G.; PALMA, A.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 725-735, 1989.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatments for leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 301-370, 2011.

SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; LAKHAL-NAOUAR, I.; DUNCAN, R.; SALOTRA, P.; NAKHASI, H. L. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. **Journal of Tropical Medicine**, 2012. 12p.

SILVA, R. A.; MERCADO, V. T. C.; HENRIQUES, L. F.; CIARAVOLO, R. M. C.; WANDERLEY, D. M. V. Magnitude e tendência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 15, n. 3, p. 617-26, 2012.

SKRABA, C. M.; PEDROSO, R. B.; FIORINI, A.; ROSADO, F. R.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 411–417, 2014.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; DUBÉ, S.; CHAGNON-DUBÉ, M.; BOILY, Y.; BORREMANS, F.; SCHAMP, N.; ANTEUNIS, M. J. 1', 2' -Dideacetylboronolide, an α -pyrone from *Iboza riparia*. **Phytochemistry**. v. 20, p. 2753-2755, 1981.

VAN PUYVELDE, L.; LEFEBVRE, R.; MUGABO, P.; DE KIMPE, N.; SCHAMP, N. Active principles of *Tetradenia riparia*. II. Antispasmodic activity of 8(14),15-sandaracopamaradiene-7 α , 18- diol. **Planta Médica**, v. 53, p. 156-158, 1987.

VAN PUYVELDE, L.; NYIRANKULIZA, S.; PANEBIANCO, R.; BOILY, Y., GEIZER, I.; SEBIKALI, B.; DE KIMPE, N.; SCHAMP, N. Active principles of *Tetradenia riparia*. Antimicrobial activity of 8(14),15-sandaracopamaradiene-7 α ,18-diol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 269-275, 1986.

WEAVER, D. K.; DUNKEL, E. V.; VAN PUYVELDE, L.; RICHARDS, D. C.; FITZGERALD, G. W. Toxicity and protectant potencial of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Lamiales, Lamiaceae) against *Zabrotes subfasciatus* (Col., Bruchidae) infesting dried pinto beans (Fabales, Lefuminosae). **Journal of Applied Entomology**, v. 118, p. 179-196, 1994.

WEAVER, D. K.; DUNKEL, F. V.; CUSKER, J. L.; VAN PUYVELDE, L. Oviposition patterns in two species of bruchids (Coleopteran: Bruchidae) as influenced by the dried

leaves of *Tetradenia riparia*, a perennial mint (Lamiales: Lamiaceae) that suppresses population size. **Environmental Entomology**, v. 21, p. 1123- 1129, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Disponível em: <<http://goo.gl/iSw9KC>>. Acesso em 20 de setembro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2010. Report of a meeting of WHO expert Committee of the control Leishmaniasis. WHO technical report series; n. 949. Geneva, 202 p.

XIMENES, M.F.F.; SILVA, V.P.M.; QUEIROZ, P.V.S.; REGO, M.M.; CORTEZ, A.M.; BATISTA, L.M.M.; MEDEIROS, A.S.; JERONIMIO, S.M.B. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antrópico. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 128-137, 2007.

ZELNIK, R.; RABENHORST, E.; MATIDA, A. K.; GOTTLIEB, H. E.; LAVIE, D.; PANIZZA, S. Ibosol, a new diterpenoid from *Ibozza riparia*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1795-1797, 1978.7

ZERPA O.; CONVIT, J. Leishmaniasis cutânea difusa en Venezuela. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n.3, p. 30-34, 2009.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “ Atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd.”

Atividade leishmanicida das frações obtidas do extrato bruto das folhas de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd

Fabiana Borges Padilha Ferreira¹, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera¹, Diógenes Aparício Garcia Cortez², Ana Claudia Aparecida Mariano Fernandez³, Thaís Gomes Verzignassi Silveira¹, Maria Valdrinez Campana Lonardoni¹

Afiliação:

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá. Maringá - Paraná, Brasil

Av. Colombo, 5.790 Jardim Universitário Maringá - Paraná - Brasil

²Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá - Paraná, Brasil

Av. Colombo, 5.790 Jardim Universitário Maringá - Paraná, Brasil

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - Paraná, Brasil

R. Universitária, 2069 - Jardim Universitário, Cascavel – Paraná, Brasil

Autor correspondente:

Fabiana Borges Padilha Ferreira

Avenida Colombo, nº5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil.

CEP: 87020-900

Telefone: (044) 3624-1148, cel. (044) 8412-2745

E-mail: fbpferreira@hotmail.com

Atividade leishmanicida do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd.

RESUMO

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os antimoniais pentavalente atualmente usados tratamento produzem graves efeitos adversos, o que estimula a busca por novos agentes antiparasitários. Neste estudo foi avaliado o efeito do extrato bruto e frações isoladas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, citotoxicidade para eritrócitos humanos e macrófagos J774.A1. A dose letal (DL₅₀) do extrato bruto foi de 296 µg mL⁻¹ e das frações diclorometano: acetato de etila (1:1), diclorometano:acetato de etila (3:7), acetato de etila: metanol (7:3) e metanol 100% foi de 218,0, 102,4, 227,8 e 499,7 µg mL⁻¹, respectivamente. A concentração citotóxica (CC₅₀) para macrófagos J774.A1 foi de 296 µg mL⁻¹ para o extrato bruto e variou de 21 a 88 µg mL⁻¹ para as frações. O índice de seletividade terapêutico variou de 0,1 a 0,2 para as frações e foi igual a 1,4 para extrato bruto. Os resultados obtidos sugerem que o extrato bruto e as frações isoladas de *T. riparia* possuem atividade leishmanicida, apresentando ausência de toxicidade para eritrócitos humanos, apesar da toxicidade sobre macrófagos J774.A1, podendo ser uma alternativa promissora no tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Citotoxicidade, extrato bruto, frações, Lamiaceae, *Leishmania*, mirra.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Reis et al. 2012) e são endêmicas em 98 países, incluindo 72 países em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 12 milhões de pessoas são afetadas e que dois milhões de novos casos ocorrem anualmente (WHO 2013). A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, insetos do gênero *Lutzomyia* (Neves 2005), infectadas por *Leishmania* spp (Silva 2012). No ciclo de vida destes protozoários, existem duas formas evolutivas, as formas amastigotas que parasitam células do sistema mononuclear fagocitário de vertebrados (homem, animais silvestres e domésticos) e as promastigotas que são encontradas no aparelho digestório de insetos invertebrados (Selvapandiyan et al. 2012).

A doença pode se manifestar em diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com o hospedeiro (Saravia et al. 1989). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas mais importantes devido a sua magnitude, capacidade de produzir deformidades e também pelo envolvimento psicológico, social e econômico (Oliveira et al. 2014).

Nas Américas são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras da doença humana e oito espécies em animais. No Brasil, já foram identificadas como causadora da LTA seis espécies do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. Em seres humanos já foram detectadas: *Leishmania* (V.) *braziliensis*; *Leishmania* (V.) *guyanensis*; *Leishmania* (L.) *amazonensis*, e mais recentemente a *Leishmania* (V.) *lainsoni*; *Leishmania* (V.) *naiffi* e *Leishmania* (V.) *shawii*. As três principais espécies causadoras de LTA no Brasil são *L.* (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *guyanensis* e *L.* (L.) *amazonensis* (Brasil 2007).

O controle da leishmaniose tem sido um problema, pois não existem vacinas com comprovada eficácia disponíveis para humanos e a quimioterapia é realizada com os antimônias pentavalentes potencialmente tóxicos e que requerem um tratamento a longo prazo (Olliaro e Bryceson 1993). A eficácia dos antimonias é baixa para crianças quando comparado a adultos (Layegh et al. 2011). Estes fármacos induzem efeitos colaterais devido a alta toxicidade, incluindo mialgias, náusea, vômitos, arritmia cardíaca, hepatites e pancreatite (Almeida e Santos 2011).

Muitos pesquisadores investem no estudo de plantas medicinais para o tratamento e prevenção de diversas patologias. São importantes fontes de substâncias farmacológicas, muitos dos quais se constituem em matérias-primas ou protótipos para síntese de novos fármacos (Rates 2001). Diante dos desafios para o tratamento da leishmaniose, o estudo dos extratos de plantas medicinais e seus metabólitos pode ser uma estratégia para a busca de novos fármacos com atividade leishmanicida com menor toxicidade (Moreira et al. 2013).

A planta *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd., da família Lamiaceae, é um arbusto de originário do continente africano, sendo introduzida e bem aclimatada no Brasil. Conhecida popularmente como incenso, lavândula, limonete, pluma-de-névoa ou falsa mirra é utilizada principalmente como planta ornamental. A planta exala um aroma intenso muito agradável. (Martins et al. 2008). Estudos mostraram que tanto o extrato bruto como o óleo essencial extraído das folhas de *T. riparia* têm atividade antimicrobiana (Van Puyvelde et al. 1986), antiespasmódica (Van Puyveld et al. 1987), larvicida (Weaver et al. 1992), inseticida (Weaver et al. 1994), antimalarial (Campbell et al. 1997), ação repelente contra *Aedes Aegypti* (Omolo et al. 2004), antimicrobiana e analgésica (Gazim et al. 2010), acaricida e larvicida (Gazim et al. 2011) e leishmanicida (Demarchi et al. 2015a). No entanto, a atividade leishmanicida do extrato bruto e suas frações não haviam sido investigadas. A busca de novos medicamentos com menor toxicidade e maior seletividade levou ao estudo da *T. riparia* (Hoscht.) Codd, com

o objetivo de determinar a atividade leishmanicida do extrato bruto e das frações isoladas de suas folhas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material *in natura* foi coletado no Horto Medicinal da Universidade Paranaense-UNIPAR, Umuarama-Paraná, Brasil (23°45'59"S e 53°19'30"W, 391 m). A identificação botânica da *T. riparia* foi realizada pela Prof^a Dra. Ezilda Jacomassi do Departamento de Farmácia da UNIPAR, e a exsicata está à disposição no Herbário Educacional da Universidade Paranaense – HEUP, identificado pelo nº 2502.

As folhas de *T. riparia* foram coletadas no período da manhã, secas em esteira, pulverizadas a 850µm (Frighetto et al. 2005), e submetidas ao processo de maceração dinâmica com esgotamento do solvente utilizando álcool etílico 70% (v/v), seguida por filtração (Miranda et al. 2009). Em seguida, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Tecnal®, TE-211, Piracicaba-SP, Brasil) à 40° C, até a obtenção do extrato bruto (EB).

2.2 Obtenção das frações do extrato de *T. riparia*

A técnica utilizada para obtenção das frações (FRs) foi a Cromatografia em Coluna descrita por Gazim et al. (2014). Foi utilizada a sílica gel 60 (Macherey-Nagel 0,01-0,02 mm) como fase estacionária (FE) na proporção de 25:1 (sílica: extrato bruto), a qual foi ativada anteriormente a 90°C por 45 minutos (Collins et al. 1997). O EB foi misturado com sílica e hexano a uma proporção de (1:1:1), e levado em banho de areia até evaporação do solvente obtenção de um pó. Após o empacotamento da coluna com a sílica o EB previamente preparado foi colocado sobre a sílica e eluído com fases móveis de polaridade crescente: hexano 100%, hexano: diclorometano (9:1; 8:2; 7:3, 1:1, 3:7, 2:8 e 1:9), diclorometano 100%; diclorometano: acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3, 1:1, 3:7, 2:8 e 1:9), acetato de etila 100%,

acetato de etila: metanol (9:1; 8:2; 7:3, 1:1, 3:7, 2:8 e 1:9), metanol 100%, resultando em 25 frações. As FRs coletadas foram concentradas em evaporador rotativo à 45°C.

Por meio do fracionamento foram obtidas 25 frações, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel tolueno: éter etílico: ácido acético 1,75 M (1:1:1) (Codd 1985). De acordo com a revelação física (luz ultravioleta λ 254 nm) e química (Vanilina Sulfúrica) (Farmacopéia Brasileira 2010), as FRs que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reagrupadas, resultando em 10 frações. Estas 10 FRs foram submetidas à análise preliminar anti-*leishmania*, e destas, quatro apresentaram potencial leishmanicida, sendo denominadas: fração 1 (diclorometano: acetato de etila 1:1), fração 2 (diclorometano: acetato de etila 3:7), fração 3 (acetato de etila: metanol 7:3) e fração 4 (metanol 100%).

2.3 Cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para os ensaios leishmanicidas

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) criopreservadas foram descongeladas e mantidas em meio de cultura 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) 10% (v/v), 1% de urina humana, 2 mM de L-glutamina e antibióticos (100 UI mL⁻¹ de penicilina e 0,1 µg mL⁻¹ de estreptomicina; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). As culturas foram incubadas a 25°C, e os parasitos mantidos por repiques semanais em meio 199 suplementado, como descrito acima, em frascos de cultura de células de 25 cm².

2.4 Atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas até a fase logarítmica de crescimento em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA),

suplementado com SFB 10% (v/v) e 2 mM de L-glutamina. Para os experimentos, as formas promastigotas foram ressuspensas em sobrenadante de cultura e contadas em câmara de Neubauer, ajustando a concentração de promastigotas para $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ (Demarchi et al. 2015a).

A viabilidade de promastigotas foi determinada pelo ensaio colorimétrico de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA). Para isso, foi adicionado o EB de *T. riparia* nas concentrações de 1000 a $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ e suas FRs de 1000 a $1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (1,6% v/v) e realizada uma diluição em série na razão 2, diretamente em uma microplaca de 96 poços (TPP®, Suíça). A concentração de DMSO não ultrapassou 0,024% v/v no primeiro poço, não apresentando toxicidade para *Leishmania*. Em seguida, foram adicionados 4×10^6 $100 \mu\text{L}^{-1}$ de formas promastigotas em fase logarítmica em cada poço. Após 24, 48 e 72 h de incubação a 25°C , $100 \mu\text{L}$ de XTT ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) ativado com $200 \mu\text{M}$ de metossulfato de fenazina (PMS, Sigma Co Chemical; St. Louis, USA) foram adicionados a cada poço, seguido de incubação de 3h a 37°C . Os resultados foram determinados em leitor de microplacas (ASYS Expert Plus, ASYS Hitech GMBH, Áustria) a 450/620 nm (El-On et al. 2009, Williams et al. 2003). Como controle do ensaio foi utilizado a anfotericina B (AmB, Laboratório Cristalia, São Paulo, SP, Brasil) a $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, controle de turbidez (meio de cultura), controle positivo (parasitos em meio de cultura e na ausência de drogas). A dose 50% letal (DL50/24, 48, 72 h) foi calculada a partir da regressão linear do percentual de morte usando um limite de erro estatístico de 5%. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes.

2.5 Cultura de macrófagos J774-A1

Macrófagos J774.A1 mantidos em criopreservação, foram descongelados e mantidos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com SFB 20% (v/v), antibióticos (100 UI mL⁻¹ de penicilina e 0,1 µg mL⁻¹ de estreptomicina) e Anfotericina B (25 µg mL⁻¹). As culturas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e os macrófagos foram mantidos por repiques semanais em frascos de cultura de células de 25 cm² com o meio RPMI 1640 suplementado.

2.6 Citotoxicidade do extrato bruto e frações de *T. riparia* sobre macrófagos J774.A1

Uma suspensão de 1x10⁶ células mL⁻¹ foi preparada e 100 µL foi distribuído em microplaca de 96 poços. A placa foi incubada por 48 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para a aderência dos macrófagos. Após este período, foi retirado o sobrenadante e adicionado o EB nas concentrações de 1000 a 1,95 µg mL⁻¹ e suas FRs de 1000 a 1,56 µg mL⁻¹ diluídos em DMSO e preparados previamente por diluição seriada. A concentração de DMSO não ultrapassou a 0,024% v/v no primeiro poço não apresentando citotoxicidade para o macrófago. Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, realizou-se o ensaio colorimétrico do XTT para avaliar a viabilidade celular. Para isso, foi adicionado 100 µL de XTT ativado com 200 µM de PMS em cada poço da placa. Após 3h de incubação a 37 °C, a citotoxicidade foi determinada pelo leitor de microplaca (ASYS Expert Plus, ASYS Hitech GMBH, Áustria) no comprimento de onda de 450/620 nm (EL-ON et al. 2009). Os testes foram realizados em triplicata, e a citotoxicidade determinada na concentração citotóxica em 50% (CC₅₀) das células que foi calculada pela regressão linear do percentual de citotoxicidade usando um limite de erro estatístico de 5%. O Índice de Seletividade Terapêutico (IST) dos compostos foi determinado por meio da seguinte equação: CC₅₀ em células/DL₅₀ em *Leishmania*.

2.7 Atividade hemolítica do extrato bruto e frações de *T. riparia*

Foi preparada uma suspensão de hemácias humanas tipo O a 6% em solução salina 0,9% estéril com 1% de glicose (Valdez et al. 2009). Em uma microplaca de 96 poços, o EB foi adicionado nas concentrações de 1000 a 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e suas FRs de 1000 a 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluídos em DMSO. A seguir, foram adicionados 100 μL da suspensão de hemácias (6%) e a microplaca foi mantida em estufa a 37°C por 2 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1100 rpm por 5 minutos (Rotina 420 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha). Foi utilizado o Triton X-100 a 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como controle positivo de hemólise e como controle negativo, a suspensão de hemácias sem adição de nenhum dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise e calculados pela equação da porcentagem de hemólise: $(\%) = 100 - [(A_p - A_s)/(A_p - A_c)]$, na qual A_p é a absorbância do controle positivo, A_s a absorbância da amostra teste e A_c a absorbância do controle negativo.

2.8 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em DL_{50} e CC_{50} e estimados pela equação de regressão linear do percentual de inibição. Os dados foram organizados utilizando Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., USA) e submetidos a análise de variância pelo programa computacional SISVAR (Ferreira 2011). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatro frações apresentaram atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania*, foram: FR 1 (diclorometano: acetato de etila 1:1), FR 2 (diclorometano: acetato de etila 3:7), FR 3 (acetato de etila: metanol 7:3) e FR 4 (metanol 100%). Os resultados indicaram que a atividade leishmanicida mais efetiva, ocorreu nas FRs com polaridades intermediárias diclorometano: acetato de etila (1:1 e 3:7) e nas FRs com polaridades maiores (acetato de etila: metanol 7:3 e metanol 100%).

O EB e as FRs induziram a morte das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após um período de interação de 24, 48 e 72 h (Figura 1). Na maior concentração testada ocorreu 100% de atividade leishmanicida para as FRs 1, 2 e 3 e, na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o EB e as FRs 1, 2 e 3 causaram mortalidade superior a 50% (Figura 1A, B e C). A FR 4 induziu mortalidade superior a 50% apenas na maior concentração testada (Figura 1D). A anfotericina B, usada como droga de referência, apresentou valores menores de DL_{50} (1 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação ao EB e FRs de *T. riparia* testadas no experimento. Em todos os períodos estudados, a DL_{50} da anfotericina B foi menor comparada a do EB e suas FRs ($p < 0,05$) (Tabela 1). Todavia, as DL_{50} do EB e das FRs 1, 2 e 3 não foram significativamente diferente entre si ($p > 0,05$) após 24 h de exposição aos parasitos. Já a DL_{50} da FR 4 não diferiu significativamente ($p > 0,05$) da fração 3 em 24 e 48 h de exposição e do EB em 48 h, mas após 72 h foi maior do que a de todos os outros tratamentos ($p < 0,05$), ou seja, a FR 4 apresentou o menor desempenho leishmanicida em relação às demais FRs testadas.

Os valores de DL_{50} do EB e FRs para as formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* variaram de 102,4 a 732,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Demarchi et al. (2015a), estudaram com óleo essencial e o isolado 6-7 dehidrooileanona de *T. riparia* e encontraram, respectivamente, uma DL_{50} de 0,5 e 16,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Provavelmente as diferenças observadas entre as DL_{50} do EB e

das FRs (Tabela 1) se devem aos distintos compostos químicos presente em suas estruturas químicas. Ndiku e Ngule (2014) também verificaram que há presença de taninos, saponinas, flavonóides, fenóis e alcalóides na composição do extrato aquoso de *T. riparia*, e que estas substâncias poderiam estar diretamente associadas ao valor medicinal desta planta. Sadashiva et al. (2014) verificaram atividade inibidora da acetilcolinesterase e antioxidante do extrato etanólico de *T. riparia* e atribuíram estas atividades pela presença de compostos fenólicos e flavonóides na planta. Gazim et al. (2010) identificaram a presença de diterpenos, sesquiterpenos e monoterpens no óleo essencial de *T. riparia*. A atividade leishmanicida do óleo essencial provavelmente pode ser atribuída ao potencial do composto 6-7 dehidrooleanona, um diterpeno isolado pelos autores Demarchi et al. (2015a). Cardoso et al. (2015) encontraram maiores resultados leishmanicida no óleo de *T. riparia* produzido no verão, devido as altas concentrações de limoneno e fenchona. Em trabalho realizado por Búfalo et al. (2015), atribuíram a atividade leishmanicida pela presença do diterpeno isolado das raízes de *Salvia deserta*.

Os óleos essenciais também diferem do extrato bruto em razão do método de extração. Para a obtenção de óleos essenciais, normalmente são utilizados processos complexos e onerosos apresentando baixo rendimento (inferior a 1% em alguns casos) (Serafini et al. 2002, Ceschini 2011). Os extratos vegetais apresentam baixo custo, fácil acesso e é bem aceito pela população onde o acesso a medicamentos é restrito ou limitado, com incidência menor de reações adversas e em menor intensidade. São uma importante fonte de compostos bioativos, pois diversos compostos secundários podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno (Ceschini 2011). A presença destes vários compostos podem ter efeito sinérgico benéfico superior em eficácia, com relação aos componentes isolados (Sixel e Pecinalli 2005, Demarchi et al. 2015b).

Os resultados deste trabalho mostraram uma DL_{50} de até $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, cujo seu efeito manteve-se constante em 24, 48 e 72 h (Tabela 1). Este resultado mostra que a anfotericina B foi mais efetiva comparado com o EB e as FRs de *T. riparia*, mas vale ressaltar os efeitos adversos importantes da anfotericina B, como: anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas, tornando-a contra-indicada em cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (BRASIL, 2010). No entanto, há possibilidade do uso da *T. riparia* como terapia complementar ao tratamento da leishmaniose. Existem vários relatos sobre a atividade biológica da *T. riparia*, o que a torna promissora para o uso em medicamentos. Wasswa e Deogracious (2006) relataram a atividade anti-helmíntica em *Ascaris suum*. Leitão et al. (2012) e Ndamane et al. (2013) verificaram atividade antimicrobiana. O óleo essencial e os diterpenos isolados desta planta também foram relatados com atividade contra bactérias (Melo et al. 2015); contra células de linhagem carcinogênica e antioxidante (Gazin et al. 2014). Somente em 2015, o óleo essencial e um diterpeno isolado de *T. riparia* foram testados sob protozoários do gênero *Leishmania* (Demarchi et al. 2015a), e, até a presente data, esta é a primeira vez que o EB e suas FRs isoladas foram submetidos à ensaios de atividade leishmanicida.

Para citotoxicidade em macrófagos J774.A1 em 24h, a CC_{50} do EB foi de $296 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as FRs apresentaram valores variando de 21 a $88 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Demarchi et al. (2015a) encontraram uma CC_{50} igual a 0,17 e $0,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial e o diterpeno 6,7-dehidrooileanona isolado de *T. riparia*, respectivamente, os quais são bem menores do que o encontrado para o EB e as FRs isoladas de *T. riparia* neste estudo.

Os resultados do índice de seletividade terapêutico (IST) em 24 h variaram de 0,1 a 0,2 para as FRs e foi igual a 1,4 para o EB, demonstrando este ser mais seletivo para o parasito em relação às células de mamífero comparado com as FRs (Tabela 1). Almeida et al. (2014), estudou o extrato e frações de *Maxillaria picta* e encontrou índice de seletividade

maior que 1, sugerindo maior atividade contra protozoários e menor atividade contra células de mamíferos (Tabela 1).

A porcentagem de hemólise de todas as concentrações testadas das FRs foi inferior a 24,9%, sendo que a maior taxa de hemólise foi observada para a fração 1 na sua maior concentração (Figura 2). O EB também apresentou baixa toxicidade sobre hemácias humanas com uma concentração de 19,4% na maior concentração testada (Figura 2). Estes resultados diferem dos de Demarchi et al. (2015a), que encontraram hemólise de 3,2% e 18% para o óleo essencial e o diterpeno de *T. riparia*, respectivamente nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação à Anfotericina B, o EB e as FRs também apresentaram baixa atividade hemolítica, visto que a droga de segunda linha para o tratamento da leishmaniose induziu hemólise em mais de 50% das hemácias (eritrócitos) na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Demarchi et al. 2015a).

O XTT é um método que avalia a capacidade respiratória mitocondrial da *Leishmania* e outros microorganismos pela redução do sal de sódio XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) em formazan (produto colorido) pela atividade da desidrogenase mitocondrial, indicando de forma direta o número de células viáveis (Williams et al. 2003, Capusiri et al. 2008, El-On et al. 2009). O EB e as FRs de *T. riparia* provavelmente promovem a morte das formas promastigotas da *Leishmania* pela via do metabolismo mitocondrial. Em estudo realizado por Demarchi (2015a) relataram que o óleo essencial de *T. riparia* induz a morte de *Leishmania* pela via do metabolismo mitocondrial e pela ação sobre o metabolismo lipídico visto em microscopia eletrônica.

O EB e as FRs de *T. riparia* se mostraram promissores no tratamento da leishmaniose. Pesquisas com extratos vegetais de uma grande variedade de famílias e espécies têm despertado o interesse pela investigação de novas opções de tratamento para leishmaniose (Arruda et al. 2009). Estudos recentes com extratos de plantas e seus compostos isolados têm

demonstrado atividade promissora frente às formas promastigotas de *Leishmania* spp (Lima et al. 2015, Meneguetti e Facundo 2015, Silva et al. 2015, Meneguetti et al. 2015, Antinarelli et al. 2015). Assim, O EB e as FRs de *T. riparia* poderiam ser explorados para desenvolver uma nova alternativa para o tratamento da leishmaniose.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA OLS AND SANTOS JB. 2011. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* 86: 497-506.
- ALMEIDA TL et al. 2014. Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*. *Quim Nova* 37: 1151-1157.
- ANTINARELLI LMR, PINTO NC, SCIO E, COIMBRA ES. 2015. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *An Acad Bras Cienc* 87: 733-742.
- ARRUDA DC, MIGUEL DC, YOKOYAMA-YASUNAKA JKU, KATZIN AM, ULIANA SRB. 2009. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother* 63: 643-649.
- BRASIL. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2.ed.atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- BÚFALO, J.; CANTRELL, C. L.; JACOB, M. R.; SCHRADER, K. K.; TEKWANI, B. L.; KUSTOVA, T. S.; ALI, A.; BOARO, C. S. F. 2015. Antimicrobial and antileishmanial activities of diterpenoids isolated from the roots of *Salvia deserta*. *Planta Med* 82: 131-137.
- CAMPBELL WE, GAMMON DW, SMITH P, ABRAHAMS M, PURVES TD. 1997. Composição and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Med* 63: 270-272.
- CAPUSIRI ES, PINETTI GR, HUALLPARA JCT, TURBA AG. 2008. Método colorimétrico-XTT: como evaluación de alto rendimento de sustancias com actividad leishmanicida. *Biofarbo* 16: 21-27.
- CESCHINI VC. 2011. Potencial antifúngico de extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. sobre *Aspergillus flavus*. Universidade de São Paulo, Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, 97p.
- COOD LE, 1985. The genus *Tetradenia*. *FSA* 28: 13-116.
- COLLINS CH, BRAGA GL, BONATO PS. 1997. Introdução a métodos cromatográficos. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 279 p.
- DEMARCHI IG, THOMAZELLA MV, TERRON MS, LOPES L, GAZIM ZC, CORTEZ D AG, DONATTI L, ARISTIDES SMA, SILVEIRA TGV, LONARDONI MVC. 2015a. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. *Exp Parasitol* 157:128-137.
- DEMARCHI IG, TERRON MS, LOPES L, THOMAZELLA MV, PEDROSO RB, GAZIM ZC, CORTEZ D AG, ARISTIDES SMA, SILVEIRA TGV, LONARDONI MVC. 2015b.

Immunomodulatory activity of essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. in murine macrophages. *Flavour Fragr J* 38: 64-77.

EL-ON, J.; OZER, L.; GOPAS, J.; SNEIR, R.; GOLAN-GOLDHIRSH, A. 2009. *Nuphar lutea*: In vitro anti-leishmanial activity against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. *Phytomedicine* 16: 788-792.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2010. São Paulo: Atheneu. 899p.

FERREIRA DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)* 35: 1039-1042.

FRIGHETTO N, WELENDORF RM, SILVA AMP, NAKAMURA MJ, SIANI AC. 2005. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lamiaceae. *Rev Bras de Farmacogn* 15: 338-343.

GAZIM ZC, AMORIM ACL, HOVELL A MC, REZENDE CM, NASCIMENTO IAN, FERREIRA GA, CORTEZ DAG. 2010. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules* 15: 5509-5524.

GAZIM ZC, DEMARCHI IG, LONARDONI MVC, AMORIM ACL, HOVELL AMC, REZENDE CM, FERREIRA GA, LIMA EL, COSMO FA, CORTEZ DAG. 2011. Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari; Ixodidae). *Exp Parasitol* 129: 175-178.

GAZIM ZC et al. 2014. New Natural Diterpene-Type Abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant Activities. *Molecules* 19: 514-524.

LAYEGH P, RAJABI O, JAFARI MR, TABARMALEKSHAH PE, MOGHIMAN T, ASHRAF H, SALARI R. 2011. Efficacy of topical liposomal Amphotericin B versus intralesional Meglumine Antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res* 2011: 656523.

LEITÃO GG, FIGUEIREDO F DE S, DANTAS SWRM, VON GROLL A, SILVA RSF, ALMEIDA DA SILVA PE. 2012. Isolation of bioactive diterpenes from *Tetradenia riparia* by HSCCC. *Planta Med* 78: 87-102.

LIMA PC, SANTOS MGS, CALABRESE KS, SILVA ALA, ALMEIDA F. 2015. Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado. *Rev Patol Trop* 44: 45-55.

MARTINS MBG, MARTINS RG, CAVALHEIRO JA. 2008. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*). *Rev Biociên* 14: 127-140.

MELO NI, CARVALHO CEC, FRACAROLLI L, CUNHA WR, VENEZIANI RCS, MARTINS CHG, CROTTI AEM. 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Braz J Microbiol* 46: 519-525.

- MENEGUETTI DUO AND FACUNDO VA. 2015. Análisis genotóxica y antiparasitaria de extractos y sustancias aisladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) amazônico. *Rev Pan-Amaz Saude* 6: 69-70.
- MENEGUETTI DUO, LIMA RA, MACEDO SRA, BARROS NB, FACUNDO JB, MILITÃO JSLT, NICOLETE R, FACUNDO VA. 2015. Plantas da Amazônia brasileira com potencial leishmanicida *in vitro*. *Rev Patol Trop* 44 : 359-374.
- MIRANDA CG, ARANTES MDCB, REZENDE M H, OLIVEIRA LMG, FREITAS M RF, NOGUEIRA JCM, PAULA JR, BARA MTF. 2009. Caracterização farmacognóstica das folhas e sementes de *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 19: 539-544.
- MOREIRA VR, DIAS ACS, MARTINS ARP, LIMA MIS, SERRA ICPB, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF, PEREIRA SRF. 2013. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of antileishmanial extract from *Julocroton triquetra* (Euphorbiaceae). *Genet Mol Res* 12: 1132-1142.
- NDAMANE Y, KAMBIZI L, SONGCA SP, OLUWAFEMI OS. 2013. Antibacterial effectiveness of *Tetradenia riparia* extract, a plant traditionally used in the Eastern Cape Province to treat diseases of the respiratory system. *J. Med. Plants Res.* 7: 2755-2760.
- NDIKU MH AND NGULE MC. 2014. Antibacterial activity and Preliminary phytochemical screening of hot- aqua extract of *Tetradenia riparia* leaves. *Int J Pharm Life Sci* 5: 3780-3786.
- OLLIARO PL AND BRYCESON AD. 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today* 9: 323-8.
- OLIVEIRA DAS, FIGUEIREDO MF, BRAGA PET. 2014. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana da Serra da Meruoca, Ceará, no Período de 2001 A 2012. *SANARE* 13: 36-4.
- OMOLO MO, OKINYO D, NDIEGE IO, LWANDE W, HASSANALI A. 2004. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochem* 65: 2797-2802.
- RATES, S.M.K. 2001. Review: Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- REIS AS, RIOS CEP, MELO LP, COSTA GC, SILVA LA, PATRÍCIO FJB, AMARAL FMM, NASCIMENTO FMM. 2012. Atividade leishmanicida *in vitro* de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev Cienc Saúde* 14: 119-126.
- SADASHIVA CT, NAIDOO Y, NAIDOO JR, KALICHARAN B, NAIDOO G. 2014. Antioxidant and acetylcholinesterase activities of three species of the family Lamiaceae. *Bangladesh J Bot* 43: 331-335.
- SARAVIA NGL, VALDERRAMA M, LABRADA AF, HOLGUÍN C, NAVAS G, PALMA A, WEIGLE KA. 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis* 159: 725-735.

SELVAPANDIYAN A, DEY R, GANNAVARAM S, LAKHAL-NAOUAR I, DUNCAN R, SALOTRA P, NAKHASI HL. 2012. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *J Trop Med* 631460, 12p.

SERAFINI LA, SANTOS ACA, TOUGUINHA LA, AGOSTINI G, DALFOVO V. 2002. Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. 1ª Ed. Educ, 54p.

SIXEL PJ AND PECINALLI NR. 2005. Características Farmacológicas Gerais das Plantas Medicinais. *Infarma* 16: 13-14.

SILVA FO. 2012. Aspectos entomológicos das Leishmanioses. In: Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia - Leishmaniose Visceral. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais 65: 9 -21.

SILVA AAS, ALEXANDRE JB, VIEIRA LG, RODRIGUES SP, FALCÃO MJC, MORAIS SM. 2015. Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinestárgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 36: 189-194.

VALDEZ RH, TONIN LT, UEDA-NAKAMURA T, DIAS FILHO BP, MORGADO-DIAZ JA, SARRAGIOTTO MH. 2009. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 110: 7–14.

VAN PUYVELDE L, NYIRANKULIZA S, PANEBIANCO R, BOILY Y, GEIZER I, SEBIKALI B, DE KIMPE N, SCHAMP N. 1986. Active principles of *Tetradenia riparia*; II. Antimicrobial activity of 8(14),15-sandaracopamaradiene-7 α ,18-diol. *J Ethnopharmacol* 17: 269-275.

VAN PUYVELDE L, LEFEBVRE R, MUGABO P, DE KIMPE N, SCHAMP N. 1987. Active principles of *Tetradenia riparia*. II. Antispasmodic activity of 8(14),15-sandaracopamaradiene-7 α , 18- diol. *Planta Med* 53: 156-8.

WASSWA P AND DEOGRACIOUS O. 2006. The in-vitro ascaricidal activity of selected indigenous medicinal plants used in ethno veterinary practices in Uganda. *AJTAM* 3: 94-103.

WEAVER DK, DUNKEL FV, CUSKER JL, VAN PUYVELDE L. 1992. Oviposition patterns in two species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae) as influenced by the dried leaves of *Tetradenia riparia*, a perennial mint (Lamiales: Lamiaceae) that suppresses population size. *Environ entomol* 21: 1123- 1129.

WEAVER DK, DUNKEL EV, VAN PUYVELDE L, RICHARDS DC, FITZGERALD GW. 1994. Toxicity and protectant potential of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Lamiales, Lamiaceae) against *Zabrotes subfasciatus* (Col., Bruchidae) infesting dried pinto beans (Fabales, Leguminosae). *J Appl Entomol* 118:179-196.

WILLIAMS C, ESPINOSA OA, MONTENEGRO H, CUBILLA L, CAPSON T L, ORTEGA-BARRIA E, L I. 2003. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *J Microbiol Methods* 55: 813-816.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2013. Leishmaniasis, <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>,. Acesso em 13 August 2015.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Efeito leishmanicida e citotoxicidade do extrato bruto (EB) e das frações (FRs) isoladas das folhas de *T. riparia*

| Tratamento | Promastigota DL ₅₀ (µg mL ⁻¹) | | | Citotoxicidade J774.A1 CC ₅₀ (µg mL ⁻¹) | Índice de Seletividade Terapêutico (IST) |
|---------------------|---|---------------------------|--------------------------|--|---|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 24 h |
| EB | 206,0±46,8 ^b | 345,9±144,6 ^{ab} | 258,6±57,4 ^b | 296 | 1,4 |
| FR 1 | 218,0±10,6 ^b | 150,9±9,1 ^b | 171,7±17,5 ^b | 24 | 0,1 |
| FR 2 | 102,4±104,8 ^b | 178,8±11,3 ^b | 149,3±49,7 ^b | 21 | 0,2 |
| FR 3 | 227,8±9,9 ^{ab} | 295,1±294,8 ^{ab} | 297,6±88,1 ^b | 22 | 0,1 |
| FR 4 | 499,7±162,9 ^a | 635,5±160,7 ^a | 732,2±209,5 ^a | 88 | 0,2 |
| AnfoB | 0,4±0,1 ^c | 0,3±0,1 ^c | 0,4±0,2 ^c | - | - |
| ¹ CV (%) | 21,5 | 30,5 | 15,3 | - | - |

DL₅₀= dose requerida para matar 50% dos parasitas; CC₅₀= concentração citotóxica 50%; IST= CC₅₀/DL₅₀; EB: extrato bruto das folhas *T. riparia*; FR1: fração obtida com diclorometano: acetato de etila (1:1); FR2: fração obtida com diclorometano: acetato de etila (3:7); FR3: fração obtida com acetato de etila: metanol (7:3); FR4: fração obtida com metanol 100%.

Médias±desvios padrões seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (p>0,05) pelo teste de Tukey.

¹CV= coeficiente de variação. AnfoB: anfotericina B.

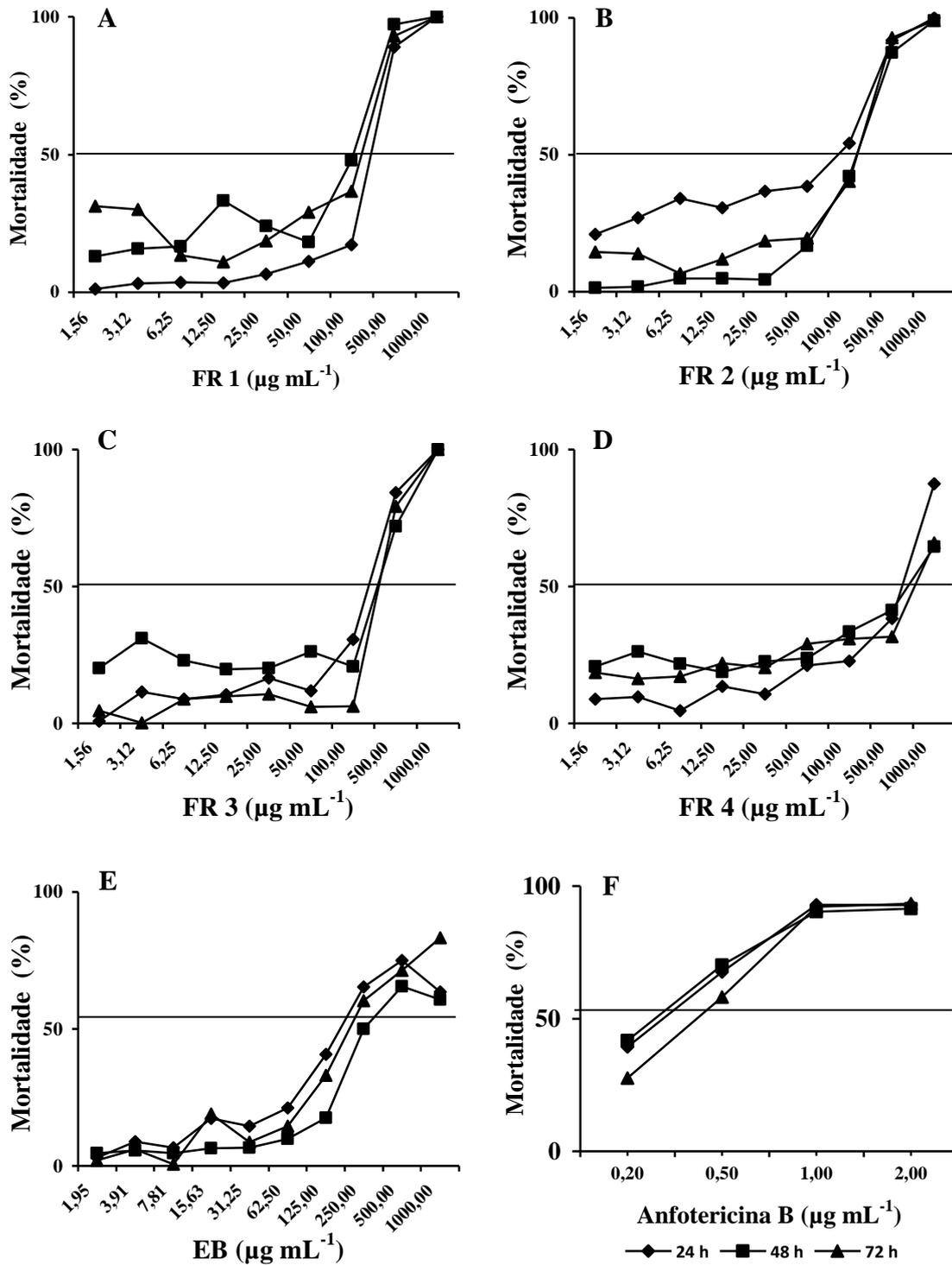


Figura 1. Porcentagem de mortalidade das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24, 48 e 72h de incubação com EB e FR *T. riparia*.

EB: extrato bruto das folhas *T. riparia*; FR1: fração obtida com diclorometano: acetato de etila (1:1); FR2: fração obtida ento com diclorometano: acetato de etila (3:7); FR3: fração obtida com acetato de etila: metanol (7:3); FR4: fração obtida.

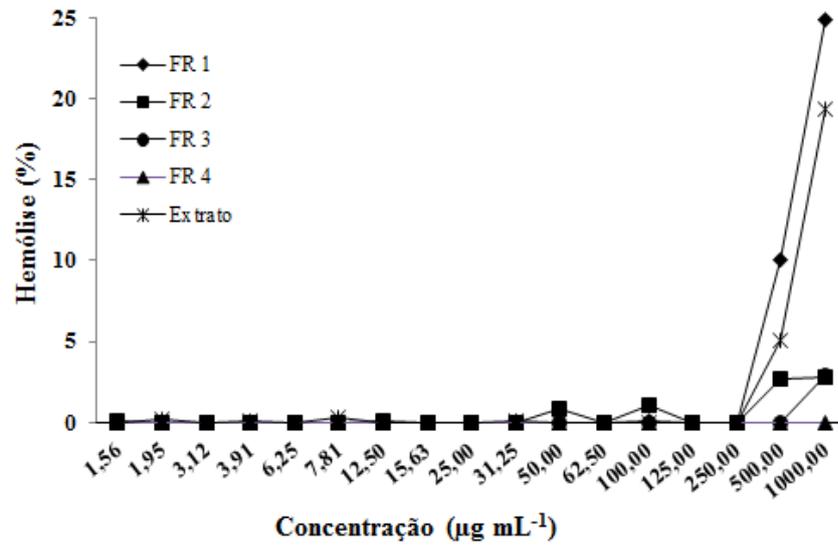


Figura 2. Porcentagem de hemólise em eritrócitos humanos tratados com extrato bruto e frações de *T. riparia*

EB: extrato bruto das folhas *T. riparia*; FR1: fração obtida com diclorometano: acetato de etila (1:1); FR2: fração obtida com diclorometano: acetato de etila (3:7); FR3: fração obtida com acetato de etila: metanol (7:3); FR4: fração obtida com metanol 100%.

CAPÍTULO III

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que os produtos naturais obtidos do extrato bruto e frações isoladas de *T. riparia* possuem efeito leishmanicida. Estas substâncias podem ser eficazes para o tratamento da leishmaniose, apresentando ausência de toxicidade para hemácias humanas, apesar da toxicidade sobre macrófagos J774.A1. Estes dados podem ser importantes para outros estudos utilizando compostos naturais de *T. riparia*.

Pesquisas futuras serão necessárias para a investigação da atividade de *T. riparia* em infecções *in vivo*, assim como a identificação dos componentes ativos responsáveis pela ação encontrada contra *L. (L.) amazonensis*, para correlacioná-los com o provável mecanismo de ação, garantindo desta forma a utilização segura da planta em questão.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O tratamento para leishmaniose ainda é um desafio, e o uso de extratos de plantas está cada vez mais sendo estudado, podendo ser uma alternativa para o tratamento da leishmaniose. O extrato bruto e as frações de *T. riparia* através dos estudos realizados, vem se mostrando bastante promissora e abre perspectivas para futuras investigações:

- Identificar os compostos químicos presentes no extrato bruto e as frações;
- Elucidar o possível mecanismo de ação;
- Verificar atividade do extrato bruto e frações de *T. riparia* em modelos animais;
- Atividade sobre formas amastigotas intracelulares;
- Demonstrar por meio de ensaios de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, as alterações morfológicas causadas nos parasitos.