

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO AGROPECUÁRIA**

TESE

**Estudo da Atividade Tripanossomicida e
Leishmanicida de Extrato, Frações e Terpenos de
croton cajucara Benth**

Gerson Silva de Lima

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA

ESTUDO DA ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA E LEISHMANICIDA
DE EXTRATO, FRAÇÕES E TERPENOS DE
CROTON CAJUCARA BENTH

GERSON SILVA DE LIMA

Sob a Orientação da Professora
Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

e Co-orientação da Professora
Maria Aparecida Maciel

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

547.71
L732e
T

Lima, Gerson Silva de, 1963-

Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de croton cajucara benth / Gerson Silva de Lima – 2014.

75 f. : il.

Orientador: Aurea Echevarria.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.

Bibliografia: f. 46-59.

1. Terpenos – Teses. 2. Plantas medicinais – Uso terapêutico – Teses. 3. Chagas, Doença de – Tratamento – Teses. 4. Leshmaniose – Tratamento – Teses. 5. Matéria médica vegetal – Teses. I. Echevarria, Aurea, 1950-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

GERSON SILVA DE LIMA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 27/02/2014

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro. Dra. FIOCRUZ

Maria Raquel Garcia Vega. Dra. UENF

Marco Antonio Soares Souza. Dr. USS

Fabio Barbour Scott. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

*A minha esposa, Luzia e as minhas filhas Twane e Thamiris,
as razões da minha vida,
sem as quais não poderia ter dado mais este passo.
Aos meus pais José e Tereza pela minha formação.
Aos amigos de sempre que ajudaram até hoje.
E a Deus sempre presente em nossas vidas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela dádiva do saber, instrumento que nos impulsiona no caminho para desvendar os frutos de sua criação. A quem nos momentos difíceis recorri e sempre me iluminou.

A minha orientadora Aurea Echevarria pela oportunidade, credibilidade, confiança. Obrigado por ter acreditado em mim e ter proporcionado esta experiência.

A minha co-orientadora Maria Aparecida Maciel incentivo que foram fundamentais para desenvolvimento da minha tese. Muito obrigado por tudo.

A todos os amigos do Laboratório Bactérias e Recombinantes que me auxiliaram no desenvolvimento da minha Tese Jade Lira, Adriana Martins, Gentil Mendonça e Rafael Resende. Muito obrigado por tudo.

Obrigado também a todos aqueles que passaram pelo laboratório Cassia Santos, Hevandro Campos e Hamilton Athyde.

Ao amigo e Doutor Marcelo Oliva por sua amizade, dedicação, palavras de força e otimismo nos momentos difíceis e por sua contribuição para desenvolvimento do trabalho realizado.

Ao Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos Gerzia Machado, Dra. Marilene Marcuzzo, Dra. Denise Castro, Dra. Leonor Leon e Dra. Lea Cysne sem elas esta pesquisa não teria sido realizada com sucesso.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, da UFRRJ, e a todos os seus professores.

Ao Gerente de Projeto Pedro Paulo Ribeiro de ajuda na elaboração da tese.

Ao Doutorando Edezio Ferreira Junior na ajuda nos experimentos e incentivo.

Ao Raouf Emile Sykora e Marco Lemos pelo apoio e incentivo.

A secretaria do PPGCTIA Renata Gomes pela competência e ajuda em todos os momentos que houve necessidade.

A coordenadora do PPGCTIA Dra. Lucia Helena dos Anjos pelas palavras de incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos amigos da Fiocruz pela ajuda, compreensão e paciência.

E, finalmente, a pessoa que sempre me incentivou, ajudou que contribuiu de forma espetacular para execução da minha tese. Aturou meu mau humor sem reclamar, foi paciente, e nos momentos difíceis sempre disse palavras de carinho, conforto. Esta pessoa sem sombra de dúvida somente Deus poderia colocar no meu caminho, Luzia Bizerra de Lima, o meu eterno amor. Obrigado por tudo que você fez e faz em minha vida. Só tenho que agradecer a Deus por ter colocado você em minha vida.

RESUMO

LIMA, Gerson Silva de. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de *Croton cajucara* Benth.** 2014. 75f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

As doenças parasitárias acometem as populações excluídas do processo de globalização mundial, os tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* são causadores da doença de Chagas e da Leishmaníose, são consideradas doenças tropicais negligenciadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). São causadoras de grande morbidade e mortalidade, pela sua característica limitante e dessa forma considerada um problema de saúde pública, pela dificuldade de acesso e adesão ao tratamento, pela falta de investimentos na criação de novos fármacos pela indústria farmacêutica e políticas sociais ineficientes. O tratamento utilizado dessas doenças não é satisfatório em relação a efetividade e toxicidade, e a resistência a drogas hoje existentes e, também, pela sensibilidade de diversas cepas a estas substâncias. Na tentativa de encontrar novos agentes anti-parasitários, as plantas medicinais têm sido pesquisadas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida e tripanossomicida de terpenos isolados de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), **DCTN**, **CTN** e **AAA**, e das frações **CC-EHA**, **F1-7**, **F25-27** e **F28**. Para este estudo foram realizados testes *in vitro* com as formas promastigotas e amastigotas (axênicas e intracelulares) de *L. amazonensis* e, com as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Utilizou-se, para avaliação da atividade anti-parasitária, o método de contagem em culturas de 24, 48 e 72 horas. Nos resultados obtidos para promastigotas de *L. amazonensis*, nas culturas de 24 h o diterpeno **DCTN** mostrou a maior atividade com um valor de $IC_{50} = 6,31 \mu\text{g/mL}$ ($20,13 \mu\text{M}$), da mesma forma para os ensaios frente às amastigotas axênicas com um $IC_{50} = 19,98 \mu\text{g/mL}$ ($63,75 \mu\text{M}$), e, também, demonstrou maior eficiência frente às amastigotas intracelulares, sendo que, após 72 horas apresentou $IC_{50} = 0,16 \mu\text{g/mL}$ enquanto que a Pentamidina utilizada como substância padrão, apresentou $IC_{50} = 0,21 \mu\text{g/mL}$. Nos ensaios das frações frente às amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foram obtidos valores de IC_{50} na faixa de 6,18 a 14,74 $\mu\text{g/mL}$, indicando atividade muito interessante. Os resultados obtidos para *T. cruzi* mostraram maior atividade para os diterpenos **DCTN** e **CTN** com valores de $IC_{50} = 10,17 \mu\text{g/mL}$ ($32,45 \mu\text{M}$) e $16,04 \mu\text{g/mL}$ ($50,85 \mu\text{M}$), respectivamente, para as formas tripomastigotas e, $IC_{50} = 23,57 \mu\text{g/mL}$ e $19,51 \mu\text{g/mL}$, respectivamente para as formas epimastigotas em culturas de 24 horas. Para as frações ensaiadas a atividade frente ao *T. cruzi*, também foi significativa tanto para as formas tripomastigotas quanto epimastigotas. Neste estudo também se investigou o mecanismo de ação das substâncias mais ativas quanto à interferência na biossíntese do ergosterol no conteúdo lipídico total, não tendo sido observado a diminuição desse esteroide. No entanto, a investigação da ação dos terpenos na via da enzima tripanotona redutase mostrou a participação dessas substâncias, sendo um dos possíveis mecanismos de ação desses terpenos.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Tripanossomatídeos. *Croton cajucara*. Terpenos.

ABSTRACT

LIMA, Gerson Silva de. **Study of the trypanocidal and leishmanicidal activity of extract, fractions and terpenes of *Croton cajucara* Benth.** 75p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Parasitic diseases affects the populations excluded from the globalization process, the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* are the cause of Chagas disease and leishmaniasis and are considered neglected tropical diseases according to the World Health Organization (WHO). These are causing high morbidity and mortality by their limiting characteristic and thus considered a public health problem due to the difficulty of access and adherence to the treatment, lack of investment in the discover of new drugs by the pharmaceutical industry and inefficient social policies. The treatment used for these diseases is not satisfactory in terms of effectiveness and toxicity, the resistance to currently used drugs, and also the susceptibility of various strains to these substances. As an attempt to find new anti - parasitic agents, medicinal plants have been researched. Thus, this study aimed to evaluate the leishmanicidal and trypanocidal activity of terpenes isolated from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), **DCTN**, **CTN** and **AAA**, and **CC- EHA** fractions, **F1-7**, **F25 - 27** and **F28**. For this study, *in vitro* tests were performed with promastigotes and amastigotes (axenic and intracellular) of *L. amazonensis*, with trypomastigotes and epimastigotes of *T. cruzi*. The method of counting in cultures of 24, 48 and 72 hours was used for evaluation of the anti-parasitic activity. In the results obtained for promastigotes of *L. amazonensis* in 24h cultures, the diterpene **DCTNs** showed the highest activity with an $IC_{50} = 6.31 \mu\text{g/mL}$ (20.13 μM), similarly to the tests facing the axenic amastigotes with an $IC_{50} = 19.98 \mu\text{g/mL}$ (63.75 μM), and also showed higher efficiency for intracellular amastigotes, and, after 72 hours showed $IC_{50} = 0.16 \mu\text{g/mL}$, while Pentamidine, used as positive control, showed $IC_{50} = 0.21 \text{mg/mL}$. In tests of fractions with axenic amastigotes of *L. amazonensis*, IC_{50} values ranging from 6.18 to 14.74 $\mu\text{g/mL}$ were obtained, indicating a very interesting activity. The results for *T. cruzi* showed greater activity for **DCTN** and **CTN** diterpenes with $IC_{50} = 10.17 \mu\text{g/mL}$ (32.45 μM) and 16.04 $\mu\text{g/mL}$ (50.85 μM), respectively, for trypomastigotes and $IC_{50} = 23.57 \mu\text{g/mL}$ and 19.51 mg/mL , respectively for epimastigotes, in 24 hours cultures. For the fractions assayed, the activity against *T. cruzi* was also significant for both trypomastigotes as epimastigotes. This study also investigated the action mechanism of the most active substances about the interferences in the ergosterol biosynthesis and in the total lipid content. The results show that no decline of this steroid. However, the investigation of the action of terpenes in the via of trypanothione reductase enzyme showed the participation of these substances, which is one of the possible action mechanisms of these terpenes.

Key words: Medicinal Plants. Trypanosomatids. *Croton cajucara*. Terpenes.

RESUMEN AMPLIADO

LIMA, Gerson Silva de. **Estudio de la actividad tripanocida y leishmanicida del extracto, las fracciones y los terpenos *Croton cajucara* Benth.** 75p. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología y Innovación en Agropecuaria). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. UFRRJ, 2014.

1. Introducción

La flora de la Amazonía es muy diversa y comprende parte de especies con características inusuales, tales como los que tienen ingredientes activos con potencial medicinal. Entre las diversas especies nativas *Croton cajucara* Benth, conocido popularmente como “Sacaca”, se destaca por su potencial medicinal, con sus hojas y corteza muy utilizada en la medicina popular para las propiedades que se le atribuyen la curación. Esta especie es una de las plantas medicinales más importantes de Brasil en la actualidad.

La enfermedad de Chagas, enfermedad parasitaria frecuente en países tropicales afecta aproximadamente a 18 millones de personas por año en todo el mundo. El medicamento indicado es el benznidazol (Roche), que es muy tóxico durante todo el tratamiento, que puede durar un promedio de tres a cuatro meses. Su uso es de beneficio comprobado en la fase aguda, pero en la fase crónica, el tratamiento se dirige únicamente a las manifestaciones.

La búsqueda de nuevos fármacos o sustancias fitoquímicas que sustituyan o complementen la terapia actual es una de las prioridades de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002).

Otra endémica en unos 90 países, la leishmaniosis, con un estimado de 12 millones a unos 350 millones de personas en todo el mundo de prevalencia se encuentran en la zona de riesgo de contagio. La leishmaniasis es también un problema grave de salud pública que tiende a aumentar debido a factores de riesgo ambiental con la migración masiva, la urbanización y la deforestación (DESJEUX, 2001).

Se llevaron a cabo estudios fitoquímicos con grandes cantidades de hojas y el tallo de corteza de *Croton cajucara*, lo que lleva al aislamiento de compuestos importantes que podrían tener razonablemente representación en los estudios biológicos. Estos estudios demostraron que la corteza del tallo es rica en diterpenos del tipo clerodano, después de haber sido aislados: dehydrocrotonin (DCTN) y crotonin (CTN), además del triterpeno ácido acetilauritólico (AAA).

La necesidad de nuevos tratamientos mediante el uso de medicamentos a base de plantas con menor toxicidad y mayor selectividad lleva a la búsqueda de nuevos y activos productos naturales. Los estudios farmacológicos realizados con *Croton cajucara* (MACIEL y ECHEVARRIA, 2002) y, más recientemente, los resultados preliminares del extracto en metanol de la corteza y la triterpeno AAA, mostró una inhibición dosis dependiente de la proliferación de *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes y tripomastigotes) (CAMPOS, 2009), indicando la importancia de continuar el estudio para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Además, el estudio en comparación con otros parásitos tales como Leishmaniasis, así como la evaluación del posible mecanismo de acción resultó ser importante para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

2. Material y Métodos

El material vegetal de la especie *Croton cajucara* Benth se recogió en Belém -PA y su identificación fue hecha por comparación con exicatas depositadas en el Museo del Herbario Emilio Goeldi (Belém-PA). La extracción y aislamiento de metabolitos especiales fueron realizados en el Laboratorio de Tecnología y el Departamento de Química de Tensioactivos en la Universidad Federal de Rio Grande do Norte (Natal- RN). Se obtuvieron del extracto hidroalcohólico de la corteza de *C. cajucara*, y después de varias particiones con disolvente en creciente polaridad **CC-EHA**, **F1-7**, **F25-27**, **F28**, **AAA**, **DCTN** y **CTN**. En este trabajo fue usada para referencia la cepa Y aislada de *T. cruzi* en pacientes humanos (NUSSENSZWEIG & SILVA, 1953) por cortesía del Laboratorio LIPMED/IOC, MHOM/BR/77/LTB0016, y la cepa de promastifotas de *L. amazonenses* del Laboratorio de Bioquímica de Tripanosomatídeos/IOC/FIOCRUZ, y las amastigotas axénicas del Laboratório de Imunoparasitologia/IOC/FIOCRUZ. La evaluación de la actividad leishmanicida de *C. cajucara* frente a *L. amazonensis* es relatada por la primera vez. La evaluación de la actividad anti-leishmaniasis fue realizada con las formas promastigotes, amastigotes axenicos y intracelulares en cultivos de 24, 48 y 72 h. Los ensayos fueron realizados por lo menos en triplicado y de manera independiente, contándose los parásitos vivos y los muertos en una cámara de Neubauer. La evaluación tripanocida *C. cajucara* contra *T. cruzi* fue realizada en las formas evolutivas epimastigotes y tripomastigotes en cultivos de 24, 48 y 72 h.

3. Resultados y Discusión

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad leishmanicida y tripanocida de terpenos aislados de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), **DCTN**, **CTN** y **AAA**, y las fracciones de **CC-EHA**, **F1-7**, **F25-27** y **F28**. Para este estudio, los ensayos *in vitro* se realizaron con promastigotes y amastigotes axénicos e intracelulares de *L. amazonensis*, con tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*. Se utilizó para evaluar la actividad anti-parasitario el método de recuento en cultivos de 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos para los promastigotes de *L. amazonensis*, en cultivos de 24 h, el diterpeno **DCTN** mostró la mayor actividad con una $CI_{50} = 6,31 \mu\text{g/mL}$ ($20,13 \mu\text{M}$), de manera similar a las pruebas los amastigotes axénicos, con una $CI_{50} = 19,98 \mu\text{g/mL}$. De manera similar **DCTN** también presentó una mayor eficiencia frente a los amastigotes intracelulares, y, después de 72 horas con $IC_{50} = 0,16 \mu\text{g/mL}$, mientras que el control positivo, pentamidina, mostró $CI_{50} = 0,21 \mu\text{g/mL}$, y menos toxicidad. En las pruebas de fracciones delante de los amastigotes axénicos de *L. amazonensis* valores de IC_{50} en el rango de 6,18 a 14,74 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvieron, que indica una actividad muy interesante. Los resultados para *T. cruzi* mostraron una mayor actividad para los diterpenos **DCTN** y **CTN** con $CI_{50} = 10,17 \mu\text{g/mL}$ y $16,04 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, para los tripomastigotes y $CI_{50} = 23,57 \mu\text{g/mL}$ y $19,51 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, para epimastigotes en cultivos de 24 horas. Las fracciones ensayadas para la actividad contra *T. cruzi*, también fueron significativas para ambos tripomastigotes como epimastigotes. Este estudio también investigó el mecanismo de acción de las sustancias más activas como la interferencia en la biosíntesis de ergosterol en el contenido total de lípidos, sin embargo, no se ha observado la disminución de este esteroide. Sin embargo, la investigación de la acción de terpenos hacia la enzima tripanotona reductase mostró su participación, indicando ser uno de los posibles mecanismos de acción destas sustancias.

4. Conclusiones

El estudio de las fracciones y los terpenos aislados de la especie *C. cajucara* utilizada en la medicina popular en la región amazónica, pone de manifiesto la importante acción de

estas sustancias y la propia especie vegetal como agente antiparasitario. Entre los terpenos estudiados **DCTN** fue el más activo tanto para los promastigotes y amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* en los cultivos de 72 horas. En los ensayos de amastigotes intracelulares se demostró que la **DCTN** es mucho menos tóxico que la pentamidina, utilizada en el tratamiento clínico y más eficiente con $CI_{50} = 0,16 \mu\text{g/ml}$. Además, entre las fracciones ensayadas contra los amastigotes axénicos la fracción F 28 fue la más activa. En la investigación del posible mecanismo de acción de los terpenos más activos frente a *L. amazonensis* fue posible sugerir que la inhibición de la biosíntesis del ergosterol no es una vía importante para la acción de estas sustancias. Sin embargo, la evaluación de la enzima de la ruta tripanotión reductasa indica que es un posible mecanismo de acción para terpenos evaluados. En la evaluación de la actividad frente a *T. cruzi* en el cultivo de 24 horas los diterpenos **CTN** y **DCTN** fueron los más activos, tanto en tripomastigotes y cuanto en los epimastigotes como valores de CI_{50} muy cerca de ser más activo para tripomastigotes con valor de $CI_{50} = 10,17 \mu\text{g/mL}$ para **DCTN** en 24 horas de cultivo y para epimastigotes. Sin embargo, el triterpeno **AAA**, menos activo, presentó valor de $CI_{50} = 16,04 \mu\text{g/mL}$, también mostró actividad significativa en las formas ensayadas. Las fracciones CC- EHA, F 1-7 y F 25-27 también mostraron resultados significativos contra las tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*.

Palabras clave: Plantas medicinales. Tripanosomatideos. *Croton cajucara*. Terpenos

LISTA DE ABREVIACOES

AAA	Ácido acetil-aleuritlico
CC-EHA	Extrato hidroalcoólico bruto
CTN	crotonina
DCTN	<i>Trans</i> -desidrocrotonina
DO	Densidade tica
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimnio Genético
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentao Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DN	Doenças Negligenciadas
ELISA	Ensaio de imunoabsoro enzimática
F1-7	leo fixo contendo sesquiterpenos menos oxigenados
F25-27	leo fixo 2 contendo sesquiterpenos mais oxigenados
F28	Frao contendo os clerodanos <i>cis</i> - e <i>trans</i> -cajucarinas B
FAD	Flavina-adenina dinucleótido
Fiocruz	Fundao Oswaldo Cruz
FS	Frao soluvel
IC₅₀	concentrao de inibio de 50%
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LIPMED	Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
LIT	Infusão de fígado triptose
µg	Microgramas
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	xido nítrico
OMS	Organizao Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reao em cadeia pela polimerase
RIFI	Reao de imunofluorescência indireta
SFB	Soro fetal bovino
THP-1	Células humanas de leucemia monocítica aguda
TR	Tripanotona redutase
pH	Potencial hidrogeniônico
VERO	Células renais de macaco verde africano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Lutzomya longipalpis</i> , díptero transmissor da Leishmaniose.	6
Figura 2	Forma promastigota de <i>Leishmania sp.</i>	6
Figura 3	Forma amastigota de <i>Leishmania sp.</i>	7
Figura 4	Ciclo clássico de transmissão de <i>Leishmania sp.</i>	7
Figura 5	Estrutura química de Anfotericina B e Pentamidina.	8
Figura 6	Triatomíneos transmissores da Doença de Chagas.	9
Figura 7	Ciclo biológico do <i>Tripanossoma cruzi</i> .	10
Figura 8	Formas epimastigotas do <i>Tripanossoma cruzi</i> .	11
Figura 9	Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>Tripanossoma cruzi</i> .	11
Figura 10	Formas amastigotas intracelulares do <i>Tripanossoma cruzi</i> .	11
Figura 11	Estruturas químicas do Benzonidazol e Nifurtimox.	12
Figura 12	Folhas, cascas e arbusto de <i>Croton cajucara</i> .	16
Figura 13	Diterpenos do tipo clerodano <i>trans</i> -desidrocrotonina (DCTN) e crotonina (CTN), e o triterpeno ácido acetilaleurítico (AAA) isolados como componentes majoritários de <i>Croton cajucara</i> Benth.	17
Figura 14	Estrutura de alguns terpenos típicos: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno.	19
Figura 15	Amostras de <i>Croton cajucara</i> para ensaios biológicos.	22
Figura 16	Estrutura química da desidrocrotonina.	30
Figura 17	Gráfico de barras comparando os valores de IC ₅₀ da DCTN e a Pentamidina frente às amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoniais nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.	31
Figura 18	Estruturas químicas e os valores de IC ₅₀ dos diterpenos alcaloidais (1) 15,22- <i>o</i> -diacetil-19-oxodiidroatisina (2) azitina e (3) isoazitina.	32
Figura 19	Gráfico de barras comparando os valores de IC ₅₀ dos terpenos frente às amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.	33
Figura 20	Gráfico de barras comparando os valores de IC ₅₀ dos terpenos frente às tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.	36
Figura 21	Gráfico de barras comparando os valores de IC ₅₀ das frações frente às tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.	36
Figura 22	Gráfico de barras comparando os valores de IC ₅₀ dos terpenos frente às epimastigotas de <i>T. cruzi</i> nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.	39
Figura 23	Gráfico de barras comparando os valores de IC ₅₀ das frações frente às epimastigotas de <i>T. cruzi</i> nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.	40
Figura 24	Cromatografia camada fina (TCL) para os ensaios da extração dos lipídeos de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> na presença e ausência de DCTN e AAA .	42
Figura 25	Estruturas químicas dos esteróides ergosterol e colesterol para comparação com os terpenos DCTN e AAA .	42

- Figura 26** Efeito do **DCTN** sobre a via tripanotiona redutase em promastigotas de *L. amazonensis*. Avaliado através da leitura densidade ótica do NADPH. 43
- Figura 27** Efeito do **AAA** sobre a via tripanotiona redutase em promastigotas de *L. amazonensis*. Avaliado através da leitura densidade ótica do NADPH. 44
- Figura 28** Efeito do **CTN** sobre a via tripanotiona redutase em promastigotas de *L. amazonensis*. Avaliado através da leitura densidade ótica do NADPH. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies do gênero <i>Croton</i> que ocorrem no Brasil.	17
Tabela 2	Volumes utilizados na cultura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> para a extração do conteúdo lipídico.	26
Tabela 3	Rendimentos das frações e terpenos obtidos das cascas de <i>C. cajucara</i> .	28
Tabela 4	Valores de IC ₅₀ dos terpenos AAA , DCTN , CTN e fração CC-EHA frente à promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em culturas de 24 h.	30
Tabela 5	Valores de IC ₅₀ , concentração tóxica e percentual de macrófagos mortos do terpeno DCTN frente amastigota intracelular de <i>L. amazonensis</i> em culturas de 24, 48 e 72 h.	31
Tabela 6	Valores de IC ₅₀ para os ensaios frente a amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> .	33
Tabela 7	Valores de IC ₅₀ de diterpenos DCTN e CTN , AAA triterpeno e óleo fração fixa CC-EHA contra <i>L. amazonensis</i> promastigotas e amastigotas axênicas em 24 h de cultura.	34
Tabela 8	Valores de percentuais de parasitos vivos nos ensaios com AAA , DCTN , CTN , CC-EHA , F1-7 , F25-27 e F28 frente à tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	35
Tabela 9	Valores de IC ₅₀ de diterpenos DCTN e CTN , o triterpeno AAA e as frações CC-EHA , F 1-7 , F 25-27 e F8 contra tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em cultura de 24, 48 e 72 h.	36
Tabela 10	Valores de percentuais de parasitos vivos de AAA , DCTN , CTN , CC-EHA , F1-7 , F25-27 e F28 frente a <i>T.cruzi epimastigota</i> 24 horas.	37
Tabela 11	Valores de percentuais de parasitos vivos de AAA , DCTN , CTN , CC-EHA , F1-7 , F25-27 e F28 frente a <i>T.cruzi epimastigota</i> 48 horas.	38
Tabela 12	Valores de percentuais de parasitos vivos de AAA , DCTN , CTN , CC-EHA , F1-7 , F25-27 e F28 frente a <i>T.cruzi epimastigota</i> 72 horas.	38
Tabela 13	Valores de IC ₅₀ para os ensaios de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	39
Tabela 14	Valores de IC ₅₀ para os ensaios com as células da linhagem THP1.	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Doenças Negligenciadas	3
2.2 Leishmaniose	3
2.2.1 <i>Leishmania sp</i>	5
2.2.2 Classificação	5
2.2.3 Transmissão	5
2.2.4 Ciclo de vida	6
2.2.5 Diagnóstico e quimioterapia	7
2.3 Doença de Chagas	9
2.3.1 Classificação e transmissão	10
2.3.2 Ciclo de vida e formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	10
2.3.3 Quimioterapia	12
2.4 Plantas Medicinais	12
2.4.1 Desenvolvimento de novos agentes antiparasitários	14
2.4.2 Produtos naturais com atividade antiparasitária	14
2.4.3 A família Euphorbiaceae	14
2.4.3.1 <i>Croton cajucara</i> Benth	15
2.4.3.2 Terpenos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Materiais	20
3.1.1 Equipamentos	20
3.1.2. Reagentes e solventes	20
3.2. Local de Realização do Trabalho de Tese	21
3.3. Identificação da Espécie e Preparação dos Extratos	21
3.3.1 Rendimento do extrato, frações e metabólitos especiais ensaiados	21
3.3.2 Solução estoque dos metabólitos especiais, extrato e frações	22
3.4 Ensaio Biológicos	22
3.4.1 Parasitos	22
3.4.2 Manutenção das formas tripomastigotas e epimastigotas para cultura de <i>T. cruzi</i>	22
3.4.3 Manutenção da cultura de <i>L. amazonensis</i>	23
3.4.4 Produção e manutenção de amastigotas axênicas em cultura de <i>L. amazonenses</i>	23
3.4.5 Triagem contra formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonens</i>	23
3.4.6 Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	23
3.4.6.1 Avaliação contra as formas epimastigotas <i>in vitro</i>	23
3.4.6.2 Avaliação contra as formas tripomastigotas <i>in vitro</i>	24
3.4.7 Avaliação da atividade anti- <i>L. amazonensis</i>	24
3.4.7.1 Avaliação contra as formas promastigotas e amastigotas axênicas	24
3.4.7.2 Avaliação contra as amastigotas intracelulares	24
3.4.7.3 Cultivo e avaliação da citotoxicidade em células THP-1	25
3.4.8 Avaliação do conteúdo de ergosterol na fração lipídica	25

3.4.8.1	Preparo dos parasitos para ensaios do ergosterol	25
3.4.8.2	Obtenção da cultura de promastigotas de <i>L. amazonenses</i>	25
3.4.8.3	Preparo de solução estoque dos produtos naturais	26
3.4.8.4	Cromatografia de camada fina	26
3.4.9	Avaliação da atividade de frente a tripanotiona redutase de <i>L. amazonensis</i>	26
3.4.9.1	Obtenção de fração solúvel (FS) de <i>L. amazonensis</i>	26
3.4.9.2	Determinação da concentração protéica	27
3.4.9.3	Avaliação da atividade de tripanotiona redutase (TR) na FS de <i>L. amazonensis</i>	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Frações e Terpenos de <i>C. cajucara</i> BENTH	28
4.2.	Atividade Anti-leishmania	28
4.2.1	Atividade anti-leishmania para promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	28
4.2.2	Atividade anti-leishmania para amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	30
4.2.3	Atividade anti-leishmania para amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	32
4.3	Atividade Anti-chagásica	34
4.3.1	Atividade para tripomastigota em <i>T. cruzi</i>	34
4.3.2	Atividade para epimastigota para <i>T. cruzi</i>	37
4.4	Avaliação da Citotoxicidade em Células THP 1	40
4.5	Investigação dos Possíveis Mecanismos de Ação dos Terpenos	41
4.5.1	Avaliação da ação dos metabólitos especiais na biossíntese do ergosterol	41
4.5.2	Avaliação da enzima tripanotiona redutase	43
5	CONCLUSÕES	45
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Protozoários são microrganismos unicelulares com um ciclo de vida complexo, mostrando estados morfológicos distintos durante seu desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados causando doenças graves, e representando o maior agente de morbidade e mortalidade em muitas áreas endêmicas. A família *Trypanosomatidae*, apresenta algumas espécies causadoras de doenças em humanos como a tripanossomíase no Continente Africano, Doença de Chagas e Leishmaniose, com grande impacto na saúde em todo mundo. O Cone Sul é a principal zona de incidência da Doença de Chagas principalmente em países da América Latina. Essas doenças, que são consideradas doenças negligenciadas, compõem um amplo problema de saúde pública que ameaça populações de países em desenvolvimento com significativas perdas econômicas.

Anualmente, os agentes etiológicos dessas doenças infectam milhões de pessoas e provocam uma alta taxa de mortalidade. Estas doenças tropicais interferem no desenvolvimento dos países atingidos de várias formas, como mortalidade prematura, custos médicos elevados e redução da produtividade, contribuindo para o agravamento de problemas sociais já existentes nos países em desenvolvimento. Os fatores que contribuem para o aumento da incidência dessas doenças tropicais incluem o aparecimento de parasitas resistentes aos fármacos usados em clínica, bem como vetores com resistência aos inseticidas e populações endêmicas crescentes em países subdesenvolvidos, em desenvolvimento e desenvolvidos devido ao processo migratório e a co-infecção devida a outras doenças.

A necessidade de novos tratamentos através do uso de fitoterápicos, por exemplo, com menor toxicidade e maior seletividade está comprovada na medida em que se estuda a biologia dos parasitas. A utilização de plantas no combate de doenças vem desde o início da civilização, e continua até os dias atuais. As plantas já eram utilizadas por nossos ancestrais e muitas delas já tiveram seu valor medicinal comprovado. O uso de plantas medicinais no Brasil vem crescendo substancialmente nos últimos anos, devido à facilidade de acesso, o baixo custo e sua compatibilidade cultural. Além disso, muitas das espécies de plantas originárias no Brasil permanecem sem estudos químicos e estas representam no contexto mundial um importante potencial econômico.

A flora da Amazônia é bastante diversificada e em parte constituída por espécies com características peculiares, como as que apresentam princípios ativos com potencial fitoterápico. Entre as diversas espécies nativas encontradas na Amazônia a *Croton cajucara* Benth, popularmente conhecida como “sacaca”, destaca-se por sua potencialidade medicinal, sendo suas folhas e cascas muito utilizadas na medicina popular devido às propriedades curativas que lhe são atribuídas. Esta espécie constitui uma das mais importantes plantas medicinais brasileiras da atualidade. Os estudos farmacológicos já realizados com *C. cajucara* e, mais recentemente, os resultados preliminares da avaliação do extrato metanólico das cascas e do triterpeno AAA, que apresentaram inibição dose-dependente sobre a proliferação de *Trypanosoma cruzi* (epimastigotas e tripomastigotas) e *Leishmania amazonensis* (amastigota e promastigota) são bastante promissores e indicam a importância na continuidade desses estudos para seu uso no tratamento das doenças parasitárias.

Assim, o objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento de novos fitomedicamentos, originados de plantas brasileiras, para o tratamento de doenças parasitárias, bem como seu possível mecanismo de ação.

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Preparar os extratos hidro-alcoólico das cascas e folhas de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae);

- Separar as frações de diferentes polaridades a partir dos extratos brutos contendo, especialmente, os óleos fixos, os diterpenos da classe dos *nor*-clerodanos desidrocrotonina (DCTN) e crotonina (CTN), e o triterpeno ácido acetil-aleurítico (AAA);
- Avaliar a atividade do extrato, frações e produtos naturais isolados frente ao *Trypanosoma cruzi* cepa Y e *Leishmania amazonensis* nas diferentes formas evolutivas;
- Avaliar o possível mecanismo de ação anti-parasitária, através do efeito sobre a enzima tripanotona redutase e da biossíntese do ergosterol na fração lipídica dos parasitas, para os extratos, frações ou metabólitos isolados que apresentaram atividade significativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doenças Negligenciadas

As doenças parasitárias permanecem sendo uma barreira para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres, e são frequentemente chamadas de “doenças negligenciadas”, “doenças órfãs” ou “doenças tropicais” (NWAKA & RIDLEY, 2003). A maioria do total das mortes que ocorrem em regiões situadas abaixo da linha do Equador é devido às doenças parasitárias (KETTER & MARJANOVIC, 2004). A necessidade de novas escolhas terapêuticas é urgente, os investimentos globais em pesquisa e desenvolvimento de fármacos e vacinas ainda são muitos precários. (KETTER & MARJANOVIC, 2004; NWAKA & RIDLEY, 2003).

Nas últimas décadas, programas de controle da transmissão vetorial e melhoria das habitações foram voltados para eliminação e controle da doença de Chagas na América Latina. A Iniciativa do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), do Pacto Andino (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) e do Pacto da América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá), junto com a triagem dos bancos de sangue reduziram substancialmente (70%) a incidência da infecção e diminuiu o número de doença de Chagas na América Latina (MONCAYO, 2003; RASSI et al., 2010).

A busca por novos fármacos para doenças humanas negligenciadas tem se acelerado na última década, o reconhecimento destas doenças foi necessário para a redução da pobreza global. A expansão dos programas de descoberta e desenvolvimento de novas substâncias foi apoiado por investimentos, aumentando a participação da indústria e da criação de produtos de Parceria de Desenvolvimento pelas empresas farmacêuticas. Apesar destes esforços, grandes lacunas permanecem a serem descobertas, além de alguns fármacos reaproveitados e algumas novas moléculas para a malária, nenhum novo candidato foi recentemente transferido de descoberta em desenvolvimento para as principais Doenças Tropicais Negligenciadas.

As doenças negligenciadas (DN) são um conjunto de doenças infecciosas diferenciadas pelo alto nível de morbidade, entretanto com baixo nível de mortalidade. Afetam intensamente a qualidade de vida e causam impactos sócio-econômicos negativos para a população dos países mais pobres (PECOUL et al., 1999; DND, 2010; OMS, 2010; KEATEY & SMITTH., 2010; WHO, 2003).

Os números relativos ao desenvolvimento e pesquisa de novos fármacos para essas doenças preocupam, de 1975 até hoje, com exceção da malária apenas 13 novos fármacos foram aprovadas para uso na ação dessas doenças. Representando 0,9% de todos os medicamentos aprovados no período, o que está muito abaixo da necessidade da demanda atual (MORAN, 2005; PECOUL et al., 1999; MS, 2006).

Milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais carentes do planeta são afetadas pelas doenças infecciosas parasitárias, representando uma crescente ameaça mundial. A malária, doença de Chagas, tripanossomíase africana, leishmaniose e esquistossomose anualmente são responsáveis por incapacitar uma parte significativa da população de vários países em desenvolvimento, sobretudo do continente africano (KETTER, & MARJANOVIC., 2004).

2.2. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença antroponótica e zoonótica, transmitida por um protozoário que durante seu ciclo de vida tem como hospedeiro vertebrado tanto o homem quanto animais domésticos e selvagens como roedores, caninos e os marsupiais (NEUBER,

2008). O hospedeiro invertebrado, ao se alimentar nestes reservatórios, contamina-se e transmite ao homem a doença. No caso da antroponótica é o homem o único reservatório (TESH, 1995). A leishmaniose é um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento. Esta doença encontra-se entre as endemias consideradas prioritárias no mundo, sendo citada em 98 países e territórios, acometendo 12 milhões de pessoas, sendo que 350 milhões estão expostas à infecção (WHO, 2013). Brasil, Índia, Bangladesh e Sudão são responsáveis por 90% dos casos notificados de leishmaniose visceral (MISHRA et al., 2009). Brasil, Peru e Bolívia respondem por 90% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa enquanto que Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose cutânea. As infecções humanas são encontradas também em 16 países da Europa. Sua incidência vem crescendo cerca de dois milhões de casos mundiais ao ano (WHO, 2013).

Um grande número de mamíferos silvestres e domésticos como roedores, carnívoros, marsupiais, ungulados e primatas já foram encontrados naturalmente infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (DEANE & DEANE, 1954; LAINSON & SHAW, 1998; QUARESMA et al., 2011; MARCELINO et al., 2011; FREITAS et al., 2012; CARREIRA et al., 2012).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem como agentes causadores diversas espécies de leishmania: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi*. A doença pode se apresentar com diferentes formas clínicas: cutânea ou mucocutânea.

A LTA tem vasta distribuição mundial e no continente americano. Existem registros de casos desde o norte da Argentina até extremo sul dos Estados Unidos, com exceção do Chile e do Uruguai. É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes enfermidades, pelo seu alto grau de detecção e sua capacidade de produzir deformidades.

O Brasil está entre os países considerados altamente endêmicos, nos casos de leishmaniose cutânea no mundo. A leishmaniose tegumentar americana é uma das afecções dermatológicas que merece atenção, pela sua dimensão, assim como ao 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, 2006).

A doença tem aspectos clínicos diversos, podendo agredir a pele, as mucosas e as vísceras. A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. Um grande número de mamíferos silvestres e domésticos como roedores, carnívoros, marsupiais, ungulados e primatas já foram encontrados naturalmente infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (DEANE & DEANE, 1954; LAINSON & SHAW, 1998). As espécies citadas produzem a forma mais frequente da doença e sua clínica começa com o aparecimento uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação pelo mosquito infectado. A pápula aumenta lentamente para formar uma úlcera crônica podendo se estender de duas semanas a seis meses ou até por três anos podendo ou não curar espontaneamente (REITHINGER et al., 2007).

A forma mucocutânea inicia com úlceras simples de pele, induzindo metástases na região oronasal, ocasionando destruição do tecido em alguns casos podendo ser extremamente mutilantes. A forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas, com aspecto hanseniforme e muito difíceis de curar. Estas lesões múltiplas contêm um grande número de parasitos e são causadas pela *L. amazonensis*. Ao contrário da forma mucocutânea, que leva a um aumento da imunidade celular do hospedeiro, a leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se pela falta de resposta celular e pela não resposta ao teste de Montenegro (LAINSON, 1983).

No Brasil, a maior parte dos casos em humanos ocorria no Nordeste. Nos últimos anos as regiões Sudeste e Norte adquiriram uma dimensão significativa desses casos. Na década de

90 mais de 85% das notificações ocorriam no Nordeste, a partir de 2007 esse percentual permanece inferior a 50% dos casos (SESA, 2009). Cerca de 75% dos registros no Brasil estão nas regiões Norte e Nordeste. No Nordeste, a endemia é persistente também em áreas de colonização antiga, especialmente nas zonas serranas dos estados do Ceará, Paraíba e Bahia (VERONESI, 2005).

A ação do homem sobre o meio ambiente na região Sudeste modificaram profundamente as características epidemiológicas da doença. Em Minas Gerais, podem ser vistos focos no Vale do Rio Doce, e também focos atuais na periferia de Belo Horizonte (LUZ et al., 2001; SESA, 2009).

2.2.1. *Leishmania* sp

O gênero *Leishmania* (Filo protozoa: Ordem Kinetoplastida: Família: Trypanosomatidae) descrito por Ross em 1903 envolve protozoários unicelulares e heteróxicos, transmitidos a vários mamíferos por vetores dípteros da família *Psychodidae*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* (Figura 1) no Novo Mundo (READY, 2010; SHUKLA et al., 2010) com ampla distribuição nas regiões com climas quentes e temperados (BORASHI & NUNES, 2007). O gênero abrange cerca de 20 espécies, existentes em duas formas morfológicas a forma flagelada promastigota e a forma amastigota, parasita intracelular obrigatório de macrófagos de mamíferos (WHO, acessado em abril de 2013).

2.2.2. Classificação

As espécies que infectam o homem que causam as leishmanioses são classificadas em complexos e agrupadas em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com o tipo de desenvolvimento dos flagelados no trato digestivo dos flebotomíneos, entre outros aspectos (LAINSON & SHAW, 1987). O subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) possui desenvolvimento predominante nos intestinos médio e anterior e, desenvolvimento suprapilário e para a *Leishmania* (*Viannia*) desenvolve-se uma fase que ocorre no intestino posterior (desenvolvimento peripilário).

2.2.3. Transmissão

A transmissão ocorre pela picada das fêmeas infectadas de insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, Figura 1, (VENDRAMETTO et al., 2010). Existem cerca de 20 espécies e subespécies do parasita que são responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas da doença, que vão desde uma úlcera na pele que cicatriza sozinha até uma doença mais grave, como a leishmaniose visceral (GIAROLLA et al., 2010; VENDRAMETTO et al., 2010).

Durante o repasto sanguíneo do mosquito ocorre a infecção do hospedeiro invertebrado por formas amastigotas. Quando os parasitos alcançam o intestino médio do inseto, são envolvidos por uma membrana quitinosa, chamada matriz peritrófica, transformando-se em flagelados pequenos, com formas ovaladas e com pouca mobilidade e com alta taxa de multiplicação. Em alguns dias, transformam-se em formas promastigotas delgadas e longas, que rompem a matriz peritrófica, fixam nas vilosidades intestinais do inseto e migram para as porções anteriores do tubo digestivo, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicos (MICHALICK, 2005).

Através de endocitose os promastigotas são internalizados mediados pelos receptores na superfície do macrófago. As leishmanias apresentam os lipofosfolípidos, que intervêm nas funções das células macrófagicas e dendríticas, e na proteína de membrana metaloprotease gp63, a qual as protege da lise mediada pelo sistema complemento e facilitando a entrada nos macrófagos (MURRAY et al., 2005). Dentro do fagolisossomo, os

promastigotas se transformam em amastigotas, sendo capazes de controlar o pH do vacúolo digestivo e multiplicando-se por divisão binária no interior do fagolisossomo. Na falta de controle parasitário na célula hospedeira os amastigotas são liberados após o rompimento e serão internalizados por outros macrófagos (MICHALICK, 2005).



Figura 1. *Lutzomyia longipalpis*, díptero transmissor da Leishmaniose

Fonte: <http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/gclanzaro/lab/images/sandflybylanzaro.jpg>

2.2.4. Ciclo de vida

O ciclo de vida do parasita compreende a forma promastigota flagelada (Figura 2) que se encontra na fêmea do inseto flebotomíneo, vetor do parasita e a forma amastigota (Figura 3), presente nos hospedeiros mamíferos (SOUZA et al., 2009; VENDRAMETTO et al., 2010). As formas amastigotas são parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos, e raramente são encontradas em outros tipos de células (LEOPOLDO et al., 2006). No macrófago, as formas amastigotas são encontradas no fagolisossomo onde se multiplicam e crescem (SOUZA et al., 2009).



Figura 2. *Leishmania sp*, forma promastigota (fonte: ViqarZaman, 1979). Clínica Sinclair Stammers/TDR/OMS)

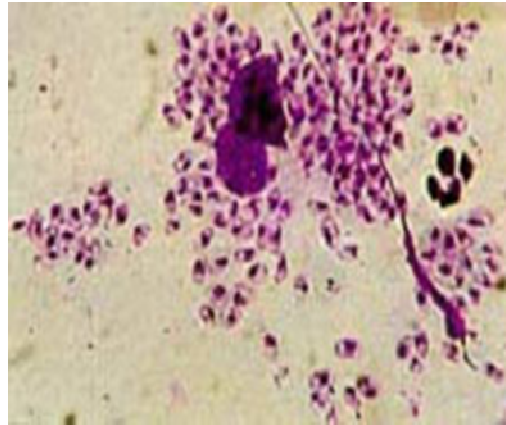


Figura 3. *Leishmania sp.*, forma amastigota (Fonte: Atlas de Parasitologia)

A Figura 4 ilustra o ciclo clássico de transmissão da *Leishmania spp.* desde o repasto sanguíneo do vetor até o desenvolvimento da doença.

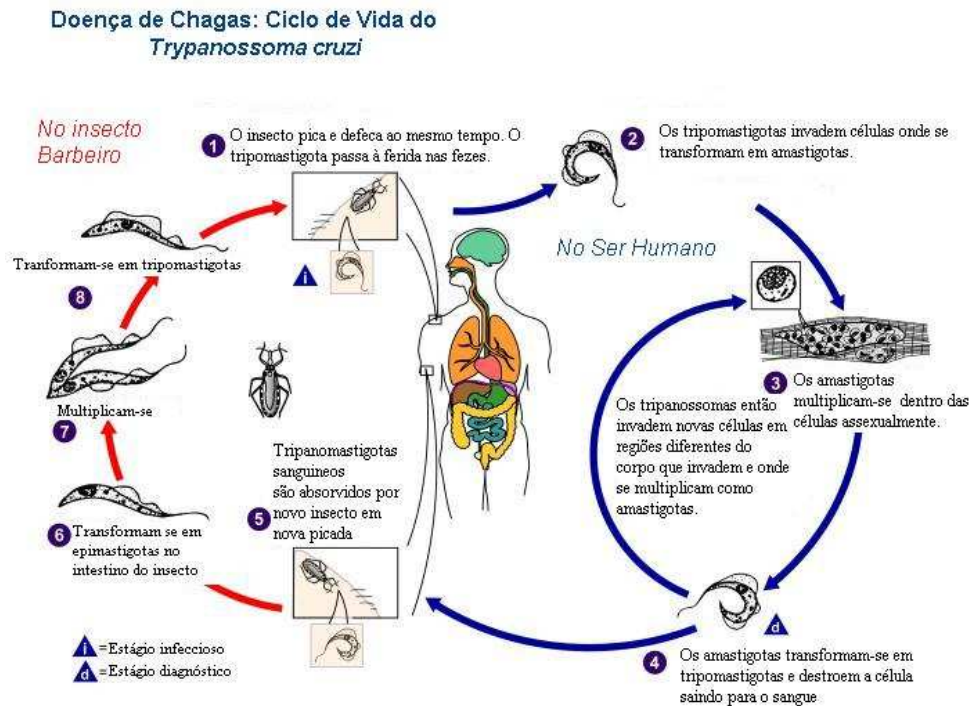


Figura 4. Ciclo clássico de transmissão de *Leishmania sp.* Fonte: pt.wikipedia.org

2.2.5. Diagnóstico e quimioterapia

O diagnóstico da leishmaniose baseia-se em diversos aspectos como clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico parasitológico é feito através de visualização de esfregaço em lâminas, isolamento em meios de cultura e inoculação em animais de laboratório utilizando biópsia ou punção aspirativa de material de medula, baço, fígado e linfonodos. A sensibilidade varia dependendo do tecido analisado a especificidade destes métodos é de 100% (MARZOCHI et al., 1993). No Brasil o diagnóstico sorológico é realizado com maior frequência sendo usado o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sendo o ELISA mais sensível e menos específico que a

RIFI (GONTIJO & MELO, 2004). Métodos moleculares também são empregados como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que possui alta sensibilidade (MANNA et al., 2008).

A alta toxicidade dos fármacos utilizados atualmente e as formas resistentes de *Leishmania* têm impulsionado as pesquisas para a síntese de novos compostos sintéticos, semi-sintéticos e produtos naturais, principalmente os fitoterápicos tradicionalmente usados para o tratamento de parasitoses (TEMPONE et al., 2005).

Diversas classes de metabólitos especiais têm sido reportadas na literatura como eficientes agentes leishmanicidas (CARVALHO & FERREIRA, 2001). Alguns alcalóides da classe dos quinolínicos (FOURNET et al., 1993; FOURNET et al., 1994; FOURNET et al., 1996), isoquinolínicos (AKENDENGUE et al., 1999); e indólicos (MUNOZ et al., 1994) tem sido reportados como promissores frente a distintas espécies de *Leishmania*.

O tratamento da leishmaniose através da quimioterapia é baseado na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimoniatos, entre eles os mais usados são o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®). Outros medicamentos como Pentamidina e Anfotericina B (figura 5) também são utilizados quando este tipo de tratamento não é efetivo e, são de administração injetável e precisam de supervisão clínica ou hospitalização devido à severidade dos efeitos colaterais (CHAN-BACABAND & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

O tratamento da leishmaniose não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, a resistência às drogas já existentes e a sensibilidade de diferentes cepas às mesmas também dificultam o tratamento (OSÓRIO et al., 2007).

Uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade é a utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças no início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CARVALHO & FERREIRA, 2001).

Tradicionalmente as plantas são usadas para o tratamento de doenças causadas por protozoários e vêm recebendo importante atenção em pesquisas na procura de novas substâncias com atividade antiparasitária (TEMPONE et al., 2005), onde os extratos e metabólitos especiais de plantas podem prover uma imensa fonte de agentes medicinais (ROCHA et al., 2005).

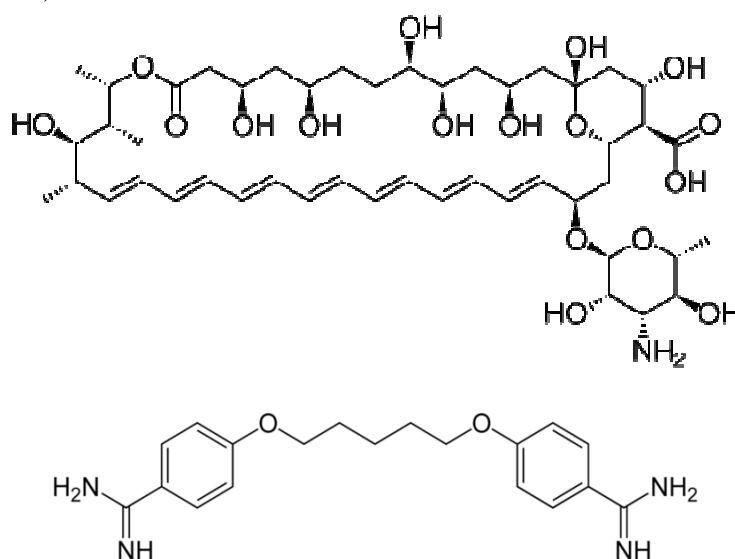


Figura 5. Estrutura química de Anfotericina B e Pentamidina
Fonte: Wikimedia Commons.org repository

Em locais endêmicos, devido à dificuldade ao acesso de medicamentos, vários pacientes acabam utilizando tratamentos populares para aliviar os sintomas, muitas vezes esses tratamentos também são utilizados juntamente como o tratamento tradicional (CHAN-BACABA & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Alguns metabólitos secundários encontrados em plantas vêm sendo estudados no tratamento de doenças parasitárias, incluindo alcalóides e acetogeninas presentes em plantas da família da Annonaceae (TEMPONE et al., 2005; OSÓRIO et al., 2007).

2.3. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário denominado *Trypanosoma cruzi* é transmitida pelo inseto triatomíneo (hemíptero hematófago da família Reduviidae). Esse protozoário pertence ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (CHAGAS, 1909; LANA & TAFURI, 2000; SCHMUNIS, 2000; REY, 2001) (Figura 5).

O Brasil ganhou em junho de 2006, a certificação referente à erradicação da transmissão da doença de Chagas pelo seu vetor principal (*Triatoma infestans*) e pela via transfusional, concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde (Opas), da OMS. Porém, existe mais de 42 espécies de triatomíneos relacionados no Brasil, reforçando a necessidade de ações de vigilância (VINHAES, 2006; DIAS, 2000; DIAS, 2006). Além disso, também foi registrada a transmissão da doença por novos vetores (PETHERICK, 2010).

A doença de Chagas compreende duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda, caracterizada por alta parasitemia no sangue, podendo ser letal em indivíduos imunocomprometidos e em crianças, ou evoluir para a doença crônica que tem como característica a baixa parasitemia, tendo evolução longa e podendo causar cardiopatia grave (COURA, 2009; DIAS, 2009).

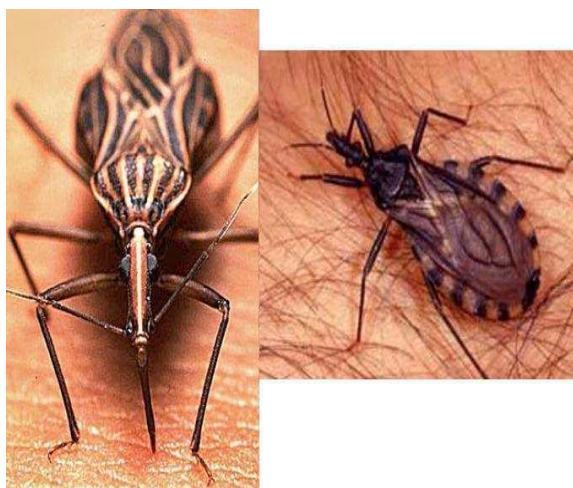


Figura 6 triatomíneos transmissores da Doença de Chagas
Fonte: Disponível em <http://www.sciencedaily.com/> <http://cbme.USP.br>

Aproximadamente 3,5 milhões de pessoas estavam vivendo com doença de Chagas no Brasil no início dos anos 2000. Ainda que a transmissão fosse completamente obstruída, pela distribuição da faixa etária na prevalência da doença e pela sua mortalidade, passar-se-iam muitas décadas para que sua erradicação fosse total antes que a doença pudesse ser considerada erradicada (MASSAD, 2007).

Ultimamente, a disseminação internacional da doença passou a existir através dos viajantes e imigrantes, considerando-se que a infecção pelo *T. cruzi* ocorre congenitamente, por via oral, transfusão de sangue e transplante de órgãos (SCHMUNIS & YADON, 2010; COURA & VIÑAS, 2010).

2.3.1 Classificação e transmissão

Existem três ciclos de transmissão vetorial o domestico, o silvestre e o peridomestico. O ciclo de maior importância epidemiológica é o domestico, já que envolve a infecção em seres humanos. Neste ciclo, o vetor cresce e se multiplica em fendas nas paredes, buracos nos telhados, debaixo e atrás de moveis, quadros e outros pontos das residências com paredes de barro ou tijolo cru e telhados de palha (BRENER et al., 2000).

Os principais mecanismos de transmissão são pelo contato com as fezes e urina de triatomíneos contaminados cujo principal gênero é o *Rhodnius*. (figura 6)

2.3.2. Ciclo de vida e formas evolutivas do *Trypanossoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta três estágios no seu ciclo de vida (Figura 7), ilustra o ciclo biológico de transmissão do *T. cruzi* apresentando o ciclo no inseto e o ciclo em mamíferos dotado de características morfológicas e biológicas diferentes. São elas as seguintes formas evolutivas: *epimastigota* (encontrada no tubo digestivo do vetor) (Figura 8), *tripomastigota* (encontrada no vetor, sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado) (Figura 9) e *amastigota* (encontrada no interior de células do hospedeiro vertebrado) (Figura 10) definidas com base na forma geral da célula (esférica, piriforme e alongada), na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral). Ao chegar ao estômago, a forma *tripomastigota* transforma-se gradativamente em formas arredondadas, algumas com um longo flagelo colado ao corpo e outras com um curto flagelo, chamada de *epimastigotas*. Posteriormente, os parasitas migram para o intestino, onde se multiplicam como formas *epimastigotas*, o que pode ser observado cerca de 25 horas após o repasto sanguíneo. Finalmente, migram para a parte mais posterior, atingindo o reto, e transformam-se em *tripomastigotas* metacíclicos, que são eliminados junto com as fezes e urina do triatomíneo (SOUZA, 1999).

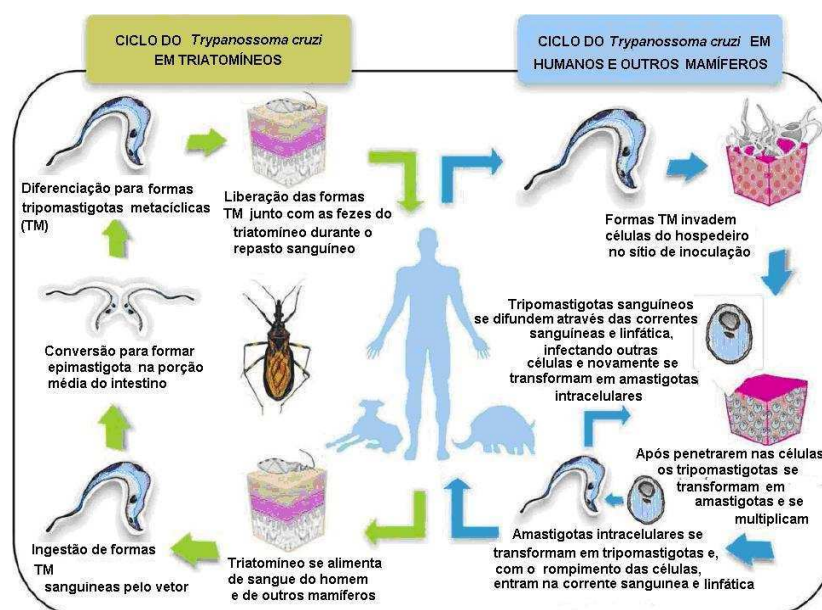


Figura 7: Ciclo biológico do *T. cruzi*.

Fonte: Disponível em: <http://miriamsalles.info/wp/?p=3512>. Acesso em: 19 de abril de 2011.

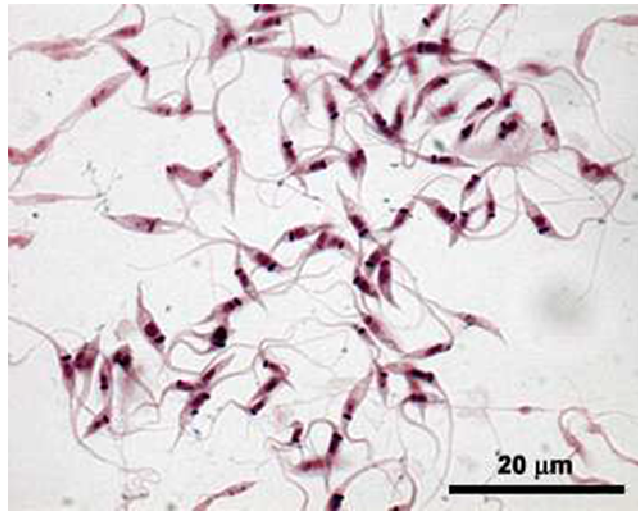


Figura 8. Formas epimastigotas do *T. cruzi*.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>

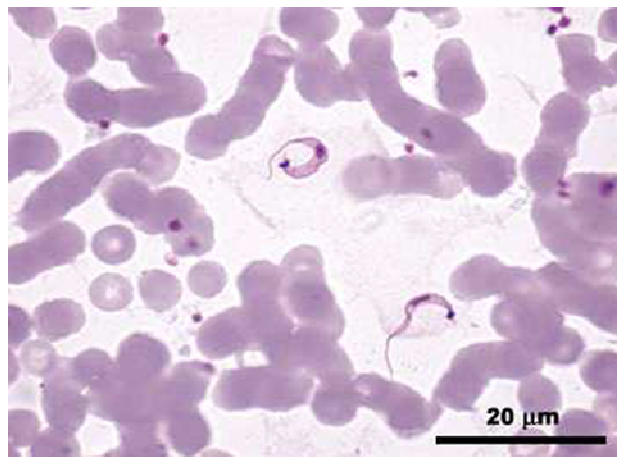


Figura 9. Formas tripomastigotas sangüíneas do *T. cruzi*.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>



Figura 10. Formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>

A infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando os parasitas eliminados pelo inseto na forma *tripomastigotas* metacíclicas, são inoculados na pele ou mucosas do vertebrado. A maneira mais comum é a vetorial, através da picada do barbeiro, que, durante o processo de ingestão do sangue, deposita suas fezes próximas ao local da picada (SOUZA, 1999).

2.3.3. Diagnóstico e quimioterapia

Diversas cepas de *T. cruzi* foram isoladas de diversos países e zonas geográficas. Diferenças importantes na resistência às substâncias em uso, em teste em laboratório, ou em estudos clínicos, foram descritas entre as diferentes cepas do parasito, dificultando a busca por novos fármacos anti-*T. cruzi* (MORELO et al., 1994).

O fármaco mais frequentemente utilizado no tratamento da Doença de Chagas no Brasil é o Benzonidazol (Figura 11A) um derivado nitroimidazólico, com cujo nomenclatura é 6-*N*-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, desenvolvido na década de 1960. Esse composto é ativo na fase aguda da Doença de Chagas, curando cerca de 70% dos infectados, mas apresenta eficácia limitada na forma crônica da doença, com expressivos efeitos colaterais, provavelmente como consequência de lesões oxidativas ou redutivas nos tecidos do hospedeiro. Estes efeitos colaterais, os quais incluem anorexia, vômitos, polineuropatia periférica, reações de hipersensibilidade, e, mais raramente, leucopenia e trombocitopenia, podem, em alguns casos, impedir a continuação do tratamento (URBINA & DO CAMPO, 2003; SANTORO et al., 2007).

Outro fármaco utilizado foi o Nifurtimox (Figura 11B) que foi retirado do mercado devido aos vários efeitos colaterais sofridos pelos pacientes (RASSI et al., 2002) e, desde a década de 1980, o Nifurtimox teve a sua comercialização descontinuada, primeiro no Brasil e em seguida em outros países da América do Sul (COURA & CASTRO, 2002).

Atualmente, a quimiorresistência apresentada pelos parasitos está muito presente em alguns países onde os fármacos usados em clínica não são mais utilizados com eficiência. Mesmo com as dificuldades, a falta de novos agentes tripanocidas e o aumento da resistência conduziram os estudos para melhor entendimento dos mecanismos de ação e compreensão da quimiorresistência (BOIBESSOT et al., 2002).

Na literatura atual, observam-se investigações sobre a atividade tripanocida com uma grande variedade de extratos naturais, especialmente os vegetais, os componentes isolados e os semi-sintéticos (COURA & CASTRO, 2002). Estudos em diferentes países, incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, México e Colômbia vêm mostrando muitas plantas com atividade contra o *T. cruzi* (MUELAS-SERRANO et al., 2000; WENINGERET et al., 2001; ABE et al., 2002; IGWEH et al., 2002).

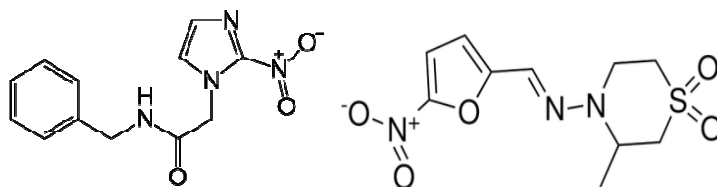


Figura 11. Estruturas químicas do Benzonidazol e Nifurtimox.

2.4. Plantas Medicinais

A variedade química e as diferentes bioatividades das plantas vêm acarretando o desenvolvimento de centenas de novos fármacos (LUIZE et al., 2005). Principalmente quando se trata de plantas brasileiras considerando a extensa e diversificada flora do país (YUNES et al., 2001).

Pela diversidade da flora e aos aspectos culturais na utilização de plantas na forma de extratos brutos ou infusões, o seu uso tornou-se prática muito comum na terapêutica de infecções no Brasil (CALIXTO, 2000, ITOKAWA et al., 2008). Apesar da descoberta de que muitas moléculas com propriedades curativas tenham se originado de investigações com produtos naturais de origem vegetal, a produção em larga escala de muitos desses fármacos requer processos especiais de obtenção dos princípios ativos além de estudos de modelagem molecular e síntese química para sua obtenção.

O Brasil possui uma biodiversidade de sua flora com plantas nativas e adaptadas que lhe atribuem um grande potencial para desenvolvimento de fitoterápicos e outros fármacos a partir de insumos vegetais. As culturas tradicionais brasileiras utilizam com frequência as plantas medicinais com propriedades curativas, e esse conhecimento é transmitido ao longo de gerações (Brasil, 2006).

Plantas são importantes fontes para a descoberta de novas substâncias, sobretudo com ação antiparasitária, devido à associação entre a convivência dos parasitos, seres vivos e plantas medicinais (ANTHONY et al., 2005). Os produtos naturais proporcionam moléculas com impacto intenso na saúde humana, metabólitos secundários são produzidos na natureza com características biológicas distintas. Diversos estudos já legitimaram o efeito de produtos naturais como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de doenças tropicais causados por protozoários e outros parasitos (MISHRA et al., 2009).

O metabolismo das plantas é formado por um conjunto de reações químicas que estão ocorrendo ininterruptamente nas células. A síntese de compostos como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos, essenciais para a sobrevivência dos vegetais, faz parte do metabolismo primário. Paralelamente, os compostos sintetizados em outras vias, não demonstram ter relação com a sobrevivência do vegetal, fazendo parte do metabolismo secundário (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007). Muitas substâncias produzidas pelo metabolismo secundário possuem características biológicas importantes e estão inteiramente envolvidas nos mecanismos que permitem a adaptação da planta ao seu meio. Diversos metabólitos secundários têm diferentes funções biológicas, agindo na proteção contra raios ultravioletas, na defesa contra herbívoros e microrganismos, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (FUMAGALI et al., 2008).

Devido à viabilidade restrita de agentes quimioterápicos leishmanicidas eficazes em áreas endêmicas, uma ampla parte da população que vive nestes lugares depende de plantas medicinais que são usadas em tratamentos populares para tratar e aliviar os sintomas da leishmaniose (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

O Brasil é o país com maior variedade genética vegetal do mundo, descrito com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO & SILVA, 2006), apenas 8% desse percentual biológico foi avaliado na procura de compostos bioativos das 1.100 espécies vegetais analisadas em suas propriedades medicinais. Sendo que 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (SIMÕES et al., 2004).

A pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade vem sendo apoiada pela Organização Mundial de Saúde através de seu Programa de Doenças Tropicais e, tem considerando a investigação sobre o uso plantas no tratamento da leishmaniose como essencial e de alta prioridade (OMS, 2012).

O uso de plantas para obtenção de novos fármacos tem aumentado pela necessidade do combate a microrganismos resistentes aos fármacos sintéticos atuais e da melhora no controle de doenças endêmicas (CROFT & COOMBS, 2003; SHARIEF et al., 2006).

O significativo desenvolvimento da pesquisa de produtos naturais nos últimos anos deve-se especialmente ao rápido progresso de técnicas de isolamento e análise dos compostos bioativos em plantas e pela facilidade da busca de informações em diversos sistemas de bases de dados. O alvo principal da pesquisa fitoquímica é conhecer as espécies vegetais e seus

constituintes químicos através do isolamento e identificação dos metabólitos secundários (WRIGLEY et al., 1997, PINTO et al., 2002).

2.4.1. Desenvolvimento de novos agentes antiparasitários

O desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária ocorre pelo estabelecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, pela investigação de substâncias já aprovadas para o tratamento de outras doenças, uma vez que elas já foram submetidas a ensaios clínicos ou, através da determinação de alvos específicos identificados em vias metabólicas importantes para o parasito. Diversos estudos têm permitido a identificação de alvos potenciais em *T. cruzi* e leishmanias (DO CAMPO, 2001).

Um dos estudos mais promissores é o conhecimento sobre a síntese de esteróis em fungos que levou à possibilidade de interferência nesta via resultando no desenvolvimento de uma grande quantidade de fármacos para o tratamento de micoses superficiais e sistêmicas. Os tripanossomatídeos, assim como fungos, sintetizam ergosterol, mas não colesterol. Nestes parasitos, etapas da biossíntese de esteróis, que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos, têm sido intensamente estudadas como alvo quimioterápico (MELOS & ECHEVARRIA, 2012).

Tripanossomatídeos possuem um metabolismo de tióis peculiar no qual o sistema glutationa/glutaciona redutase é substituído por tripanotiona/tripantionna redutase (TR). Esta enzima mantém a tripanotiona na sua forma reduzida e assim capaz de ser oxidada para tripanotiona redutase, levando à redução dos níveis de radicais livres e contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor. TR pertence à família das FAD-dissulfeto oxirredutase que compreende além da glutaciona redutase, a lipoamida desidrogenase e a tiorredoxina redutase. A determinação da estrutura do centro ativo de TR permitiu a busca de inibidores, tendo sido estudada uma grande variedade de compostos que interferem nessa via metabólica (MELOS & ECHEVARRIA, 2012).

2.4.2. Produtos naturais com atividade antiparasitária

As plantas e seus extratos têm sido usados por muitos séculos como terapêutica de diferentes doenças, desde dores de cabeça até infecções parasitárias, apenas nos últimos anos as pesquisas começaram a determinar quais medicamentos procedentes de plantas seriam ativos e quais seriam seus mecanismos de ação (ANTHONY et al., 2005; VIEIRA et al., 2008). Estima-se que entre 65-80% da população mundial é dependente inteiramente das plantas como medicamentos (OGBADOYI et al., 2007). O Brasil tem uma posição relevante na biodiversidade mundial, por apresentar áreas de importância de diversidade biológica: a Mata Atlântica, a Amazônia e o Cerrado (BASSO et al., 2005). Diversas plantas são usadas como medicamento natural sem qualquer base científica (BRAGA et al., 2007).

Moléculas bioativas obtidas de algumas espécies vegetais estão sendo usadas em muitos países (WILLCOX et al., 2001). Popularmente muitas receitas caseiras são usadas no Brasil. Existem relatos no Estado da Bahia, onde já foram identificadas 49 plantas sendo usadas no tratamento de lesões cutâneas causadas por *Leishmania*. Dentre elas, as fibras da casca do côco (*Cocos nucifera*) apresentaram atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e nos ensaios com macrófagos infectados foi observada diminuição de 44% na carga parasitária e aumento de 182% na produção de óxido nítrico, agente responsável pela morte amastigotas intracelular (SOARES et al., 2004).

2.4.3. A família Euphorbiaceae

A espécie vegetal estudada neste trabalho pertence à família Euphorbiaceae.

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 300 gêneros e 6000 espécies, distribuídas principalmente em regiões tropicais. Ocorrem no Brasil, cerca de 70 gêneros e 1000 espécies, sendo uma família comum na constituição da flora brasileira e com grande complexidade na sua taxonomia (SOUZA & LORENZI, 2008). As espécies apresentam látex cáustico que, quando em contato direto com mucosas, especialmente nos olhos, tem capacidade causar lesões graves (SHLAMOVITZ et al., 2009).

Algumas plantas da família Euphorbiaceae têm valor econômico como a mamona, espécie africana *Ricinus communis* L, cujas sementes são usadas na produção do óleo de rícino e de biodiesel, e a seringueira da Amazônia, *Hevea brasiliensis*, importante na produção de borracha e amplamente cultivada na Malásia e Indonésia (SOUZA & LORENZI, 2008). Outras espécies dessa família apresentam também potencial terapêutico. Destacam-se o quebra-pedras, denominação comum a várias espécies do gênero *Phyllanthus* reconhecidas por suas características diuréticas, sendo utilizadas na eliminação de cálculos renais (BAGALKOTKAR et al., 2006; KARUA et al., 2009). As plantas do gênero *Euphorbia* apresentam várias atividades terapêuticas, nas quais se destacam as atividades antivirais, antitumorais e antimalariais (MACIEL et al., 2002 *apud* SOUZA et al., 2006; BERG, 1993).

As plantas da família Euphorbiaceae são amplamente utilizadas no costume tradicional popular para fins terapêuticos. Determinadas espécies identificadas contêm compostos bioativos que atribuem a essas plantas potenciais para o tratamento de doenças (PUSZTAI et al., 2007; LAGE et al., 2009). Alguns desses compostos comprovam ter atividade sobre a atuação funcional de leucócitos do sangue periférico. Porém, ainda que seja provável sugerir que extratos de plantas do gênero *Euphorbia* intervenham no funcionamento de populações leucocitárias, os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos ainda não estão bem esclarecidos (BANI et al., 2007).

2.4.3.1. *Croton cajucara* Benth

O gênero *Croton* foi descrito por Linnaeus em 1753 ao propor 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. O gênero ganhou atenção de vários pesquisadores após esta proposta (BAILLON 1858; MUELLER 1865, 1866, 1873; BENTHAM 1880), destacando-se Webster (1992, 1993, 1994, 2001), que sugeriu a classificação infragenérica mais atualizada para o gênero (SILVA; SALES & CARNEIRO-TORRES, 2009).

A espécie *Croton cajucara* Benth (figura12), conhecida popularmente como sacaca, alvo dos estudos neste trabalho, é um arbusto grande de até 6 m de altura, nativo da Amazônia e com centro de dispersão no estado do Pará. Trata-se de uma espécie pioneira que dá início a recuperação da cobertura vegetal em áreas devastadas. A presença de linalol nas folhas desta planta em proporções acima de 60% foi comprovada há trinta anos. O chá das cascas da sacaca é empregado de acordo com a tradição na Amazônia contra diabetes, inflamações do fígado, vesícula e rins, para baixar o índice de colesterol, como auxiliar no tratamento de malária, e contra azia, gastrite e má digestão causadas pela ingestão de bebidas alcoólicas (MACIEL, 2007). O principal produto natural desta espécie vegetal bioativos apolares das cascas desta classe vegetal é o diterpeno desidrocrotina.

O gênero *Croton*, um dos mais abundantes da família Euphorbiaceae, de acordo com Pax e Hoffman, pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae. No Brasil existem mais de 300 das cerca de 700 espécies desse gênero, muitas das quais, têm suas propriedades químicas e/ou farmacológicas conhecidas (Tabela 1) (HOEHNE, 1935, ABREU et al., 2001).



Figura 12. *Croton cajucara* folhas, cascas e arbusto.
Fonte: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens

Tabela 1 - Espécies do gênero *Croton* que ocorrem no Brasil.

<i>Croton abegghii</i>	<i>Croton hemiargyreus</i>	<i>Croton pullei</i>
<i>Croton aff. mucronifolius</i>	<i>Croton heterocalyx</i>	<i>Croton rhamnifolius</i>
<i>Croton antisiphiliticus</i>	<i>Croton inaequilobus</i>	<i>Croton sacaquinha</i>
<i>Croton argyrophylloides</i>	<i>Croton jacobinensis</i>	<i>Croton salutaris</i>
<i>Croton cajucara</i>	<i>Croton junceus</i>	<i>Croton sampatik</i>
<i>Croton caperoniifolius</i>	<i>Croton maracayuensis</i>	<i>Croton sepotubensis</i>
<i>Croton celtidifolius</i>	<i>Croton matourensis</i>	<i>Croton sincorensis</i>
<i>Croton cordiifolius</i>	<i>Croton micans</i>	<i>Croton sonderianus</i>
<i>Croton crustulifer</i>	<i>Croton microgyne</i>	<i>Croton sphaerogynus</i>
<i>Croton cuneatus</i>	<i>Croton nepetifolius</i>	<i>Croton tessmannii</i>
<i>Croton echioides</i>	<i>Croton nummularius</i>	<i>Croton tetradenius</i>
<i>Croton essequiboensis</i>	<i>Croton ocalia</i>	<i>Croton urucurana</i>
<i>Croton glechomifolius</i>	<i>Croton organensis</i>	<i>Croton zehntneri</i>
<i>Croton goyazensis</i>	<i>Croton piptocalyx</i>	
<i>Croton gracilescens</i>	<i>Croton priscus</i>	

A espécie *C. cajucara* mostrou-se rica em metabólitos especiais da classe dos terpenos, tendo sido já isolados diversos diterpenos do tipo *nor*-clerodanos como *trans*-desidrocrotonina (DCTN), *trans*-crotonina (CTN), e triterpenos como o ácido acetilaleuritólico (AAA) (Figura 13).

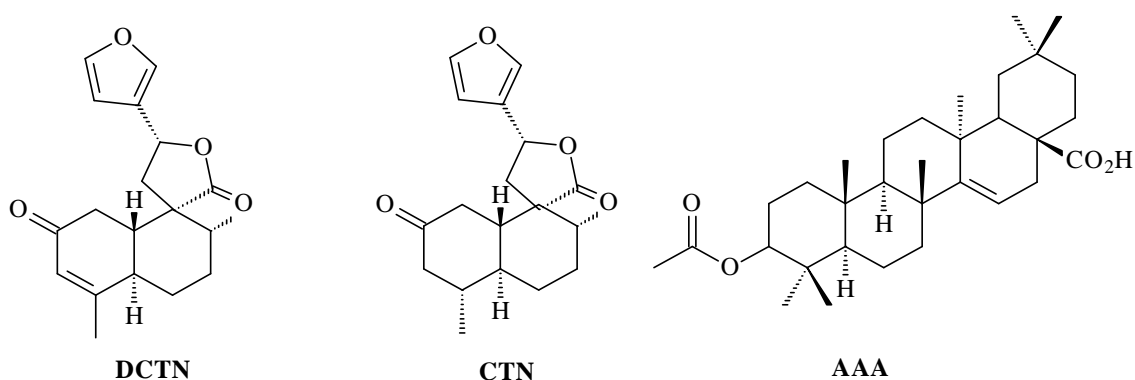


Figura 13. Diterpenos do tipo clerodano *trans*-desidrocrotonina (DCTN) e crotonina (CTN), e o triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) isolados como componentes majoritários de *Croton cajucara* Benth.

2.4.3.2. Terpenos

Os metabólitos especiais terpenos originam-se principalmente da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade de isopreno. São precursores de quatro classes hormonais de plantas, as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GAs) e os brassinoesteróides (BR).

Esses compostos podem ser encontrados, também, em organismos marinhos, microrganismos e em menor extensão em fungos (CONNOLLY & HILL, 2005). Proporcionam uma grande variedade estrutural proveniente da junção cabeça-cauda de unidades de cinco átomos de carbonos chamadas de unidades isoprênicas. As estruturas químicas constituídas por meio de ligações de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades

isoprênicas são chamadas de mono, sesqui, di, tri e tetraterpenos, respectivamente, A Figura 14 mostra um exemplo para cada sub-classe de terpenos. Dessas classes, os mono e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e das resinas. Estima-se que existam quase 30.000 terpenos identificados, sendo 4.000 relativos a triterpenos (DZUBAK et al., 2006).

Os triterpenos têm despertado amplo interesse nas pesquisas devido a seu extenso espectro de atividade biológica, como antidiabética, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica, anti-inflamatória, e antioxidante (COLOMA et al., 2011).

Os hemiterpenóides são o menor grupo dos terpenos, tendo o isopreno seu representante mais conhecido, é um produto volátil isento nos tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al., 2000).

Os monoterpenóides são compostos por duas unidades de isopreno. Possui baixa massa molecular, por isso costumam a ser voláteis, são constituintes das essências voláteis e óleos essenciais, agindo na atração de polinizadores. Hoje em dia são conhecidos mais de 1.000 monoterpenóides naturais e alguns têm sido aplicados na produção de especiarias, indústrias de perfumes e fragrâncias, indústria de alimentos e condimentos, e na culinária, (VIEGAS JR, 2003).

Os sesquiterpenos são hidrocarbonetos, compostos por três unidades isopreno, apresentando o oxigênio em sua composição, sendo chamados de hidrocarbonetos oxigenados. São encontrados em espécies vegetais e insetos como agentes de defesa e feromônios.

Os diterpenóides incluem um amplo grupo de compostos não voláteis, tendo extensas atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Peres (2004) apresenta que possivelmente o papel principal exercido por um diterpeno fosse o das giberelinas, na qual são importantes hormônios vegetais responsáveis expansão dos frutos de muitas espécies vegetais, pela germinação de sementes, alongamento caulinar entre outros.

Os triterpenóides compõem as resinas, látex, ceras e cutículas das plantas. Dentre os triterpenos, estão uma enorme classe de substâncias, os esteróides. Outra classe importante são as saponinas. Nas plantas, as saponinas desempenham um papel relevante na defesa contra insetos e microorganismos (PERES, 2004).

Os politerpenóides possuem mais de oito unidades de isopreno, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como polímeros localizados na borracha (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

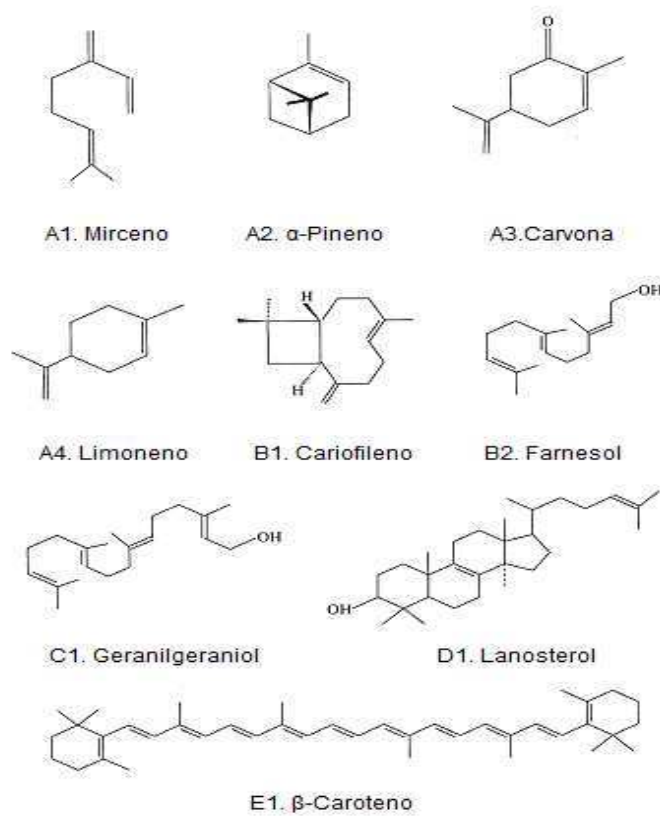


Figura 14. Estrutura de alguns terpenos típicos: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno.
 Fonte: Marriott et al, 2001.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos

Estufa bacteriológica Nova Etica 150
Aparelho Soxhlet
Cabine de segurança química VECO
Centrífuga Mikro 120 analítica
Agitador magnético
Cabina de segurança biológica Bio Seg 09 VECO
Microscópio invertido Zeiss
Balança analítica
Espectrofotômetro μ Quant (Biotek-Instrument Inc., Winooski)

3.1.2. Reagentes e solventes

Meio LIT Liver Infusion Triptose
NaCl cloreto de sodio
KCl cloreto de potassio
Na₂HPO₄ Fosfato de sódio monobásico
Triptose
Infuso de fígado
H₂O destilada
Hemoglobina de sangue bovino
Meio DMEM (Gibco)
Meio Schneider Schneider's Insect Medium
NaHCO₃ 0,0075 M Bicarbonato de sodio 0,0075 molar
CaCl₂ cloreto de calcio
Azul de Trypan
Pentamidina
Benzonidazol
Gentamicina
Meio RPMI
Corante hematológico Instant Prov
Meio NNN (Novy, McNeal & Nicole),
NADPH
Ágar
Sangue desfibrinado de coelho
Meio RPMI-1640
DMSO
Hepes
L-glutamina
Penicilina
Estreptomicina
SFB Soro bovino fetal
Etanol a 95%

3.2. Local de Realização do Trabalho de Tese

O trabalho experimental foi realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica e também no Instituto Oswaldo Cruz no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos todos pertencentes à Fundação Oswaldo Cruz.

3.3. Identificação da Espécie e Preparação dos Extratos

A espécie vegetal *Croton cajucara* Benth utilizada foi obtido no mercado Ver-o-peso de Belém/PA. Uma prévia identificação botânica da planta foi feita por Nelson A. Rosa do Museu Paraense Emílio Goeldi, tendo sido depositada uma exsiccata no herbário deste Museu, sob código 247.

A extração e isolamento dos metabólitos especiais foram feitos no Laboratório de Tecnologia e Tensoativos do Departamento de Química na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal-RN).

Foram coletados 6 kg de cascas para o isolamento de grandes quantidades dos metabólitos especiais, possibilitando suas avaliações farmacológicas. Durante a coleta foram monitorados os seguintes itens: separação e etiquetagem do material coletado; embalagem em sacos plásticos; transporte do material; pesagem do material úmido; secagem do material; pesagem do material seco; armazenagem; moagem; pesagem do material triturado; obtenção de extratos.

A armazenagem foi feita em sacos plásticos, acondicionados em caixas de papelão guardadas em local seguro, com baixa umidade e temperatura para a preservação e posterior obtenção dos óleos essenciais. Desta maneira, preveniram-se reações de oxidação, hidrólise, ataque de microorganismos, entre outros. A extração foi feita em aparelho Soxhlet a partir das cascas do tronco moído em torno de 24 h em etanol : água como solvente, esta extração apresenta menor risco de reações químicas, formação de artefatos, decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente através do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) sob a resolução nº 29, de 6 de dezembro de 2007 que dispõe sobre o enquadramento de óleos fixos, óleos essenciais e extratos no âmbito da Medida Provisória nº2.186-16, de 23 de agosto de 2001 pelo Decreto no 3.945, de 28 de setembro de 2001.

O CGEN considera que a elaboração de óleos fixos, essenciais e de extratos comerciais, embora envolva atividades de isolamento de componentes do patrimônio genético, em determinados contextos não caracteriza o acesso ao patrimônio genético, o Art. 1º não se enquadra no conceito de acesso ao patrimônio genético a elaboração de óleos fixos, de óleos essenciais ou de extratos quando esses resultarem de isolamento, extração ou purificação, nos quais as características do produto final sejam substancialmente equivalentes à matéria prima original.

3.3.1. Rendimento do extrato, frações e metabólitos especiais ensaiados

Foram obtidas as seguintes frações, e respectivos rendimentos a partir do extrato hidroalcoólico das cascas de *C. cajucara* após as diversas partições com solventes em polaridade crescente (Figura15):

CC-EHA	3,4 g Extrato hidroalcoólico bruto - tem a composição total dos constituintes químicos.
F1-7	994 g

	Óleo fixo - grupo das frações apolares de 1 a 7 contendo sesquiterpenos menos oxigenados.
F25-27	1,1 g Óleo fixo 2 – grupo de frações apolares de 25 a 27 contendo sesquiterpenos mais oxigenados.
F28	2 g Fração de polaridade mediana contendo os clerodanos <i>cis</i> - e <i>trans</i> -cajucarinas B.
AAA	100 g Triterpeno - ácido acetil aleuritólico
DCTN	445 g Diterpeno <i>trans</i> -desidrocrotonina
CTN	100 g Diterpeno <i>trans</i> -crotonina



Figura 15. Amostras de *Croton cajucara* para ensaios.

3.3.2. Solução estoque dos metabólitos especiais, extrato e frações

Os metabólitos especiais, extrato e frações foram inicialmente diluídos em DMSO a uma concentração de 5mg/ml. Esta solução foi dissolvida em meio de cultura para obter uma solução a 1mg/ml e uma concentração de DMSO não tóxica de 0,01%. Ambas as soluções foram guardadas a -20°C e protegidas da luz.

3.4. Ensaio Biológicos

3.4.1. Parasitos

Neste trabalho utilizou-se a cepa de referencia Y de *T. cruzi* isolada de paciente humano (Silva & Nussenzweig, 1953) cedida pelo Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED/IOC) cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis* cedida pelo Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos /IOC.

3.4.2. Manutenção das formas tripomastigotas e epimastigotas para cultura de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram obtidas a partir da infecção de monocamadas de células VERO (Células renais de macaco verde africano) com formas epimastigotas em meio DMEM pH 7,5 suplementado com 5% de SBF a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após 72 horas de infecção, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 300 g por 30 minutos em temperatura ambiente e mantidos em repouso por uma hora a 37°C.

As formas tripomastigotas os parasitos foram obtidas a partir da coleta do sobrenadante desta cultura em repouso obtendo-se aproximadamente 1×10^6 parasitos.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT cuja composição é: NaCl 4,0 g; KCl 0,4 g; Na_2HPO_4 8,0 g; Triptose 5,0 g; Infuso de fígado 5,0 g; H_2O destilada 880 mL; Soro bovino 100 mL; Hemoglobina de sangue bovino 20 mL; 0,8 mg/mL de estreptomicina; 800U/mL de penicilina e pH entre 7,2 e 7,4 foi mantida por transferências semanais no meio LIT suplementado com o soro bovino fetal de 10% em 26 °C. O volume do meio de cultura em cada tubo foi de 8 mL. A proporção de antibiótico por tubo com LIT foi de 0,8 mg/mL de estreptomicina e 800U/mL de penicilina. Os parasitos foram obtidos na fase exponencial de crescimento, lavados duas vezes em tampão salina fosfato pH 7,4 e centrifugado a 1500 g por 10 minutos e suspensos em meio LIT e a concentração ajustada para 5×10^6 epimastigotas/mL.

3.4.3. Manutenção da cultura de *L. amazonensis*

A cultura de *L. amazonensis* nas formas promastigotas foi realizada em meio Schneider complementado cuja composição é: 24,5 g de meio Schneider, NaHCO_3 0,0075 M, CaCl_2 0,1 M e, suplementado com soro fetal bovino inativado a 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina e pH 7,1.

Os parasitos foram mantidos por transferências a cada 3 dias no meio de cultura Schneider em pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino armazenado em estufa 27 °C.

3.4.4. Produção e manutenção de amastigotas axênicas em cultura de *L. amazonenses*

As formas amastigotas axênicas foram produzidas a partir do cultivo de promastigotas de *L. amazonensis* (fase metacíclica) segundo o protocolo de Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998) em meio Schneider com pH 7,2 armazenado na estufa 26 °C. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para determinar a viabilidade parasitária. A cultura no décimo sexto dia já estava em condições de uso, procedeu-se, assim, ao choque térmico para obtenção final da cultura de amastigotas axênicas.

3.4.5. Triagem contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

Com o objetivo de triar as frações com possível atividade biológica contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp., os extratos, frações e compostos foram diluídos em uma concentração inicial de 150 $\mu\text{g/mL}$ incubados em placas de 96 poços, contendo uma concentração de 4×10^6 parasitos/mL por 24 h. Como controle negativo, os parasitos foram incubados na ausência de amostras e com DMSO 1%; como controle positivo utilizou-se Pentamidina (0,1 $\mu\text{g/mL}$) para os ensaios com *L. amazonensis* e Benzonidazol (10 $\mu\text{g/mL}$) nos testes contra *T. cruzi*. Os experimentos foram avaliados qualitativamente em microscópio invertido, e aqueles que demonstraram 50% de inibição na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ foram utilizados em ensaios com diluições sequenciais, a fim de avaliar a atividade biológica contra diferentes formas evolutivas dos parasitos.

3.4.6. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

3.4.6.1. Avaliação contra as formas epimastigotas *in vitro*

Os ensaios foram realizados em triplicatas em microplacas de 96 poços, contendo um volume total de 200 μL por poço, sendo 100 μL de meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma) em cada poço, foi retirado 6 μL e adicionado 6 μL das amostras em concentrações em ordem decrescente de 150, 75, 37,5,

18,76, 9,38, 4,69, 2,34, 1,18, 0,586 µg/mL para as substâncias puras **AAA**, **DCTN**, **CTN** e frações **F1-7**, **F25-27** e extrato **CC-EHA** para a fração **F28** nas concentrações 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,38, 0,19 µg/mL diluídas em DMSO estéril, acrescido de 100 µL da suspensão de epimastigotas na concentração de $(2,5 \times 10^5)$ parasitas/mL por 24, 48 e 72 h. Como controle, os parasitos foram incubados na ausência das amostras, na presença de 1% de DMSO e na presença de 10 µg/mL de Benzonidazol. Após a adição das amostras, as placas foram homogeneizadas e incubadas à 26 °C e avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitas. A atividade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer para posterior avaliação estatística. Os resultados foram expressos em valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas vivos). Os ensaios foram repetidos 2 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade das amostras e a reprodutibilidade dos resultados.

3.4.6.2. Avaliação contra as formas tripomastigotas *in vitro*

Neste ensaio, os parasitos foram incubados em placas de 96 poços, em triplicata, em meio de cultura LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma) nas concentrações em ordem decrescente de 150, 75, 37,5, 18,76, 9,38, 4,69, 2,34, 1,18, 0,586 µg/mL para as frações **AAA**, **DCTN**, **CTN**, **F 1-7**, **F25-27** e extrato **CC-EHA** para a fração **F28** nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,38, 0,19 µg/mL diluídas em DMSO estéril, acrescido de 100 µL da suspensão de tripomastigota na concentração de (4×10^5) tripomastigotas/poço). Após 24, 48 e 72 horas de incubação, os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer. As diferentes concentrações das amostras foram avaliadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% o crescimento ou a viabilidade dos parasitos (IC₅₀). O como controle positivo foi o utilizado o benzonidazol na mesma concentração utilizada na avaliação de epimastigota.

3.4.7. Avaliação da atividade anti-*L. amazonensis*

3.4.7.1. Avaliação contra as formas promastigotas e amastigotas axênicas

As avaliações das atividades anti-leishmania frente a *L. amazonensis* nas formas promastigotas e amastigotas axênicas, foram realizada em meio de cultura Schneider com pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino nas concentrações em ordem decrescente de 150, 75, 37,5, 18,76, 9,38 µg/mL para as frações **AAA**, **DCTN**, **CTN**, **F 1-7**, **F25-27** e extrato **CC-EHA** para a fração **F28** nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL diluídas em DMSO estéril, acrescido de 100 µL. As culturas em microplacas de 96 poços foram incubadas a 26 °C, por 24, 48 e 72 h. Os extratos, frações e produtos naturais isolados foram avaliados em diferentes concentrações e dissolvidos em DMSO. Posteriormente, os parasitas vivos foram contados em câmara de Neubauer. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

A atividade antiparasitária foi avaliada pela contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular dos compostos foi avaliada pelo cálculo do IC₅₀. Como controles, os parasitos foram incubados na ausência das amostras, na presença de 1% de DMSO e na presença de 10 µg/mL de Pentamidina como controle positivo.

3.4.7.2. Avaliação contra as amastigotas intracelulares

Para a avaliação da atividade sobre amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais murinos foram obtidos por lavagem peritoneal (Figura 16) com 5 mL de meio RPMI gelado (Sigma). O lavado peritoneal foi ajustado à concentração de 2×10^6 macrófagos/mL, plaqueado em câmaras LAB-TEK e incubados por 1 hora a 37 °C e 5 % CO₂. As células aderidas foram incubadas com promastigotas de *L. amazonensis*, na razão de

3:1, a 37°C e 5 % CO₂. Após 4 h, as câmaras foram lavadas novamente, para remover os parasitos livres. As monocamadas foram incubadas com as substâncias em teste, por 24, 48 e 72 h a 37°C e 5 % CO₂. Após o período de incubação, a atividade anti-amastigota foi avaliada microscopicamente, corando-se as câmaras com o sistema de corante hematológico Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil) e contando pelo menos 100 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IF} = \% \text{ células infectadas} \times \text{número de amastigotas/número total macrófagos.}$$

O cálculo do IC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica, no *GraphPad Prism* 5.0. Os resultados foram obtidos em dois experimentos independentes, realizados em duplicatas.

Todos os procedimentos envolvendo animais experimentais foram realizados de acordo com protocolos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA- Fiocruz) sob o número do protocolo LW07/10.

3.4.7.3 Cultivo e avaliação da citotoxicidade em células THP-1(células humanas de leucemia monocítica aguda)

A linhagem de células de leucemia monocítica humana aguda THP-1 (TSUCHIYA, *et al.*, 1980) foi obtida do Laboratório de Imunologia Clínica da Fiocruz e cultivada em garrafas de cultura de 75 cm² contendo 12 mL de RPMI 1640, pH 7,4 suplementado com 10% (v/v) de SBF, 12,5 mM de tampão HEPES, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM de Glutamina, 1mM de Piruvato de Sódio e mantidas em uma estufa a 37°C e atmosfera 5% de CO₂. A linhagem foi mantida através de repiques no 3º ou 4º dia de crescimento e reinoculadas a uma densidade de 3 x 10⁵/mL, após uma lavagem em PBS, o número de células viáveis foi determinado pelo teste de exclusão do azul de trypan (0,02%), quantificado em Câmara de Neubauer e ajustado a concentração desejada em meio RPMI completo. Para os experimentos, utilizaram-se células com no máximo 15 passagens.

A contagem e a avaliação da viabilidade das células THP-1 foram realizadas num hemacitómetro (câmara de Neubauer) da Albert Sass (profundidade - 0,1mm; 1/400 mm²), utilizando um microscópio AE21, da Motic.

3.4.8. Avaliação do conteúdo de ergosterol na fração lipídica

3.4.8.1. Preparo dos parasitos para ensaios do ergosterol

As promastigotas foram obtidas a partir de amastigotas isoladas de lesão de camundongos Balb/c infectados, inoculadas em meio bifásico, onde a fase sólida era constituída de meio NNN (Novy, McNeal & Nicole), contendo ágar com 15% de sangue desfibrinado de coelho e como fase líquida o meio Schneider, pH 7,2, esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (56 °C durante 30 min), adicionado de 1 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de estreptomicina. A cultura de promastigotas foi mantida em estufa incubadora B.O.D. com passagens semanais consecutivas em meio Schneider e a temperatura de 26 °C.

3.4.8.2. Obtenção da cultura de promastigotas de *L. amazonensis*

As promastigotas foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em meio Schneider suplementados com o soro bovino fetal a 10% em 26 °C por 72 h. O volume do meio de

cultura final foi de 15 mL Após as 72 h diluíram-se as amostras 1/10 em PBS e contou-se em câmara de Neubauer. Preparou-se 3 garrafas de 25 cm² com um volume de 10 mL para os seguintes compostos AAA, DCTN e controle, seguindo a Tabela 2. Posteriormente, extraiu-se o conteúdo de lipídeos segundo o protocolo Bligh e Dyer (1959).

Tabela 2. Volumes utilizados na cultura de promastigotas de *L. amazonensis* para a extração do conteúdo lipídico.

	Terpenos	DMSO	Meio + soro bovino	Parasito
Controle do parasito	–	17,8 µL	8982,2 µL	1 mL
DCTN	4 µL	13,8 µL	8982,2 µL	1 mL
AAA	17,8 µL	-	8982,2 µL	1 mL

3.4.8.3. Preparo de solução estoque dos produtos naturais

Foram preparadas soluções estoques dos compostos para os testes baseados nos valores de IC₅₀ com um valor padrão de 50 µM. Todas as amostras foram diluídas em DMSO. Para melhor solubilização dos compostos colocou-se por 5 minutos em banho-maria a 37 °C sob agitação magnética.

3.4.8.4. Cromatografia de camada fina

Lipídios neutros de *L. amazonensis* na forma de promastigotas foram extraídos como descrito previamente (Bligh e Dyer,1959). Os parasitas foram incubados a 26 °C com meio Schneider, com SBF a 10% em a presença dos produtos naturais. Após 72 h, 1,0 ×10⁸ células de cada amostra foram colhidas e lavadas três vezes com PBS (pH 7,5). O sedimento resultante foi extraído com metanol:clorofórmio:água (10:05:04, v/v) durante 1 h. As amostras foram centrifugadas durante 20 min a 3000 rpm, e os lipídios existentes nos sobrenadantes foram separados do sedimento e os sobrenadantes foram adicionados à água: clorofórmio 1:1). Depois de 40 segundos de agitação, o material foi centrifugado (3000 rpm/30 min). A fase lipídica foi então separada, e o solvente foi evaporado. Os lipídios extraídos foram dissolvidos em clorofórmio e analisou-se por cromatografia em camada fina. A placa foi previamente impregnada com nitrato de prata a 1% em metanol de modo a obter uma melhor separação dos lipídios com ligações duplas, especialmente o ergostano. A placa foi montada em duas etapas. Na primeira execução, a metade da placa, foi eluída com hexano:acetato de etila:éter etílico:ácido acético (60:40:1, v/v), e na segunda parte utilizou-se como eluente a mistura de hexano:clorofórmio:ácido acético (80:20:1, v/v). Colesterol, lanosterol e ergosterol na concentração de 1 mg/mL foram utilizados como padrões e corridos em paralelo com as amostras para permitir a identificação das faixas

3.4.9. Avaliação da atividade frente a tripanotona redutase de *L. amazonensis*

3.4.9.1. Obtenção de fração solúvel (FS) de *L. amazonensis*

Uma suspensão de parasitos contendo 2x10⁹ na forma epimastigota foram retirados do meio Schneider contendo 10% de SFB, por centrifugação a 500 g/10 min. O sedimento foi lavado em PBS uma vez em pH 7,2 e centrifugado por mais duas vezes nas mesmas condições. Ao sedimento final foi adicionado tampão contendo 40 mM de HEPES pH 7,5 e 1 mM de EDTA. O material foi lisado por 4 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento (N₂ líquido em banho à 37 °C). Ao final, a amostra foi centrifugada a 12.500 g por 15 min, sendo o sobrenadante considerado a FS.

3.4.9.2. Determinação da concentração protéica

A concentração protéica da fração obtida (FS), foi avaliada através de leitura em espectrofotômetro μ Quant (Biotek-Instrument Inc., Winooski) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A concentração foi expressa segundo a fórmula (Johnstone & Thorpe, 1982):

$$\text{Concentração de proteína (mg/mL)} = (\text{leitura da DO a 280 nm} \times 1,5) - (\text{leitura da DO a 260 nm} \times 0,75)$$

Todas as amostras foram aliqüotadas e estocadas em nitrogênio líquido até o momento da análise.

3.4.9.3. Avaliação da atividade da tripanotona retutase (TR) na FS de *L. amazonenses*

A atividade da TR foi avaliada segundo (MORENO et al., 1994; CASTRO-PINTO et al., 2004, CASTRO et al., 2008), que consiste na leitura da absorbância a 340 nm relativa ao consumo de NADPH, que é cofator da TR.

Para o ensaio da atividade da TR frente os terpenos **DCTN**, **AAA**, **CTN**, foi utilizada a FS do extrato parasitário obtido como descrito anteriormente. Ao equivalente de 1mg/mL de proteína da FS do extrato parasitário foram adicionados os compostos na concentração de 1 mM, 40 mM de HEPES pH 7,5 e 1 mM de EDTA, além de NADPH (100 μ M) que é o cofator da enzima. Logo após, a reação foi incubada por 6 min à 32 °C e em seguida adicionado tripanotona oxidada T(S)₂ para otimizar e direcionar a reação para o consumo de NADPH pela TR, assim verificando a atividade do sistema. Paralelamente, foi feito um controle no qual não foi adicionado nenhum composto nem tripanotona.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Frações e Terpenos de *C. cajucara* Benth

Neste trabalho foi avaliado o efeito leishmanicida e tripanossomicida de frações e metabólitos especiais obtidos das cascas de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae). A escolha da espécie nesse estudo foi baseada nos diversos trabalhos existentes relatando o uso popular dessa espécie no tratamento de diversas doenças, bem como nos resultados experimentais já publicados na literatura (CAMPOS et al., 2010; MACIEL et al, 1998a, 1998b, 2000, 2006). Assim, foram avaliados os diterpenos da classe dos *nor*-clerodanos *t*-desidrocrotonina (DCTN) e *t*-crotonina (CTN), o triterpeno ácido acetilaleurítico (AAA), (Figura 12) e as frações **F 1-7** (fração rica em sesquiterpenos menos oxigenados), **F 25-27** (fração rica em sesquiterpenos mais oxigenados), **F 28** (fração rica em clerodanos *cis* e *trans*-cajucarinas B) e o extrato **CC-EHA** (extrato hidroalcoólico possui a composição total dos constituintes químicos).

O rendimento do extrato, frações e metabólitos especiais ensaiados neste trabalho foram obtidos a partir do extrato produzido utilizando-se aparelho de Soxhlet e hexano como primeiro solvente orgânico. Após as partições com solventes em polaridade crescente foram obtidos as frações e os terpenos em rendimentos conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Rendimentos de extrato, frações e terpenos obtidos das cascas de *C. cajucara*.

Terpenos	Rendimento
CTN	100 g
DCTN	445 g
AAA	100 g
Frações	
F 25-27	1,1 g
F 28	2 g
F1- 7	994 g
Extrato	
CC- EHA	3,4 g

4.2. Atividade Anti-leishmania

A avaliação leishmanicida de *C. cajucara* frente a *L. amazonensis* está sendo relatada pela primeira vez neste trabalho de tese para os diterpenos, triterpeno e frações. A avaliação da atividade anti-leishmania foi realizada frente à espécie *L. amazonensis* nas formas evolutivas de promastigotas e amastigotas em culturas de 24, 48 e 72 h. Nos ensaios com as amastigotas foram avaliadas nas formas de amastigotas axênicas e intracelulares. A avaliação em todos os ensaios foi realizada, no mínimo em triplicata e três ensaios independentes, por contagem dos parasitas vivos e mortos em câmara de Neubauer.

4.2.1. Atividade anti-leishmania para promastigotas de *L. amazonensis*

Os ensaios frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizando-se frações e produtos naturais isolados das cascas da espécie vegetal *C. cajucara* foram realizados com as concentrações de 150, 75, 37,5, 18,75, 9,38, $\mu\text{g/mL}$ para **F 1-7**, **F 25-27**, **AAA**, **CTN** e extrato **CC-EHA**, e para o diterpeno *nor*-cleorodano **DCTN** 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO 1% (v/v) em meio Schneider em culturas de 24, 48 e 72 h.

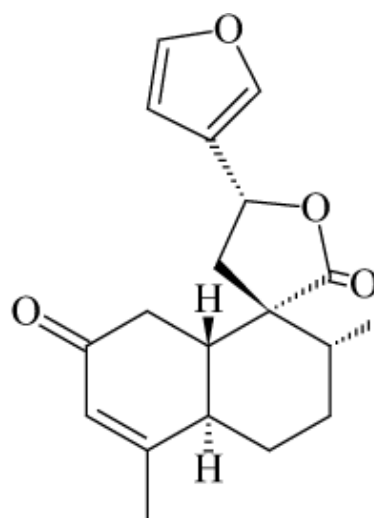
Os resultados obtidos nas culturas de 24 h possibilitaram a determinação dos valores de IC₅₀ para os produtos naturais isolados **DCTN**, **AAA** e **CTN** e, para as frações, sendo o mais ativo o diterpeno **DCTN** com valor de 6,31 µg/mL (20,13 µM). A Tabela 4 mostra os resultados obtidos. O extrato **CC-EHA**, rica em monoterpenos e sesquiterpenos, também apresentou atividade significativa frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* com valor de IC₅₀=18 µg/mL.

Os metabolitos especiais constituem uma potencial fonte de compostos bioativos contra espécies de *Leishmania*. O óleo essencial rico em linalol de *C. cajucara* foi descrito como um agente em potencial contra *L. amazonensis* (ROSA et al., 2003) que destruiu 100% das formas promastigotas e amastigota de *L. amazonensis* com uma concentração de 15 µg/mL. Diversos óleos essenciais extraídos a partir de diferentes plantas tem demonstrado atividades leishmanicida. Outros estudos demonstraram progressivo efeito leishmanicida para as formas promastigotas e amastigota de *L. amazonensis* quando tratadas com 100 µg / ml do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (branco manjerição) (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). *Cymbopogon citratus* conhecido como capim limão demonstrou um efeito significativo sobre a viabilidade de *L. infantum* com IC₅₀ de 24 h com o valor de 25 µg / mL para *L. tropica* IC₅₀ de 24h com um valor de 52 µg / mL e para *L. major* com um IC₅₀ de 48h com um valor 38 µg / mL para a forma promastigota (MACHADO et al., 2012). *Echinops kebericho*, planta encontrada na Etiópia também apresentou ser um potente agente leishmanicida contra *L. donovani* e *L. aethiopica*, com valores de concentração inibitoria mínima (CIM) de 0,0765 mg / mL para *L. donovani* e 0,0097 µg / mL e para *L. aethiopica* (TARIKU et al., 2011).

Os mecanismos de ação leishmanicidas de óleos essenciais não são completamente compreendidos. Sua afinidade lipofílica, assim como dos seus constituintes, estão possivelmente envolvidos nos mecanismos de ação em atravessar as membranas celulares e regulando a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos de membrana, fosfolipídios podendo levar a danos celulares graves (BAKKALI et al., 2008).

Importantes alterações nas cristas mitocondriais e na organização do cinetoplasto foram observados quando *L. amazonensis* foi tratada com óleo essencial rico em linalol de *C. Cajucara* (ROSA et al., 2003). Outra alteração foi o uso do óleo essencial de *C. citratus* e seu principal componente o terpeno citral que produziu mudanças na morfologia e ultraestrutura em promastigotas de *L. amazonensis*, como o inchaço mitocondrial, a presença de dois ou mais flagelos, e projeções exocíticas na bolsa flagelar (SANTIN, et al., 2009). Esses tipos de alterações ultra-estruturais em *L. amazonensis* foram relatados para ser associado com a redução de ergosterol e a alteração das propriedades físicas da membrana (SANTA-RITA, et al., 2004). (tabela 4) Diversas espécies vegetais tem sido avaliadas *in vitro* visando resultado leishmanicida de seus compostos isolados das sobre formas promastigotas de *Leishmania*, dentre eles terpenóides de *Artemisia annua* (YANG et al., 1992), de *Peperomia galioides* (MAHIU et al., 1995) e de *Guarea rhopalocarpa* (CAMACHO et al., 2000); aminoglicosteróides e aminosteróides de *Holarrhena curtisii* (KAM et al., 1997), naftoquinonas de *Pera benensis* (FOURNET et al., 1992; KAYSER et al., 2000), iridóides glicosídicos de *Picrorhiza kurroa* (MITTAL et al., 1998); flavonóides de *Centrolobium sclerophyllum* (ARAÚJO et al., 1998) e neolignananas de *Virola surinamensis* (BARATA et al., 2000).

Os resultados obtidos nesses ensaios indicaram o diterpeno **DCTN** (Figura 16) como uma nova e promissora substância que poderá atuar como agente leishmanicida.



DCTN

Figura 16. Estrutura química da desidrocrotonina

Tabela 4. Valores de IC₅₀ dos terpenos AAA, DCTN, CTN e do extrato CC-EHA frente à promastigotas de *L. amazonensis* em culturas de 24 h.

Substância	IC ₅₀		Fórmula molecular	Mol g
	µg/mL	µM		
DCTN	6,31±0,06*	20,13	C ₁₉ H ₂₁ O ₄	313,40
CTN	41,70±0,02*	89,33	C ₁₉ H ₂₃ O ₄	315,42
AAA	48,00 ±0,09*	152,18	C ₃₂ H ₅₀ O ₂	466,82
CC-EHA	18,00 ±0,01*	–	-	

*Desvio padrão

4.2.2. Atividade anti-leishmania para amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

A avaliação da atividade sobre amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais murinos foi utilizado camundongos suíços através de lavagem peritoneal e as células obtidas ajustadas à concentração de 2 x 10⁶ macrófagos/mL. Nos ensaios frente às amastigotas intracelulares foi utilizado apenas o diterpeno DCTN em tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. A utilização deste terpeno se deu por ter sido a substância que apresentou maior eficiência quando avaliado frente a *L. amazonensis* na forma de promastigotas com um IC₅₀ de 6,41. Os experimentos foram realizados nas concentrações em ordem decrescente de 37,5, 18,75, 9,38, 4,69, 2,35, 1,2, 0,58 e 0,3µg/mL. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nos ensaios frente às amastigotas intracelulares.

Nos testes realizados em culturas de 24 horas foram observados valores de IC₅₀ de 0,47 µg/mL para a DCTN e 0,35 µg/mL para a pentamidina, utilizada como substância padrão. No entanto, após 72 horas de cultura ficou evidenciado que a DCTN foi mais eficiente (IC₅₀ = 0,16 µg/mL) do que a pentamidina (IC₅₀ = 0,21 µg/mL) e com toxicidade menor, ou seja, a DCTN em concentração de até 100 µg/mL não levou nenhum macrófago à

morte, enquanto que a pentamidina em concentração de 9,38 $\mu\text{g/mL}$ matou 100% dos macrófagos não infectados.

Tabela 5. Valores de IC_{50} , concentração tóxica e percentual de macrófagos mortos do terpeno DCTN frente amastigota intracelular de *L. amazonensis* em culturas de 24, 48 e 72 h.

Substâncias	DCTN			Pentamidina			
	Tratamento (horas)	24	48	72	24	48	72
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		0,47 \pm 0,03*	0,28 \pm 0,06*	0,16 \pm 0,01*	0,34 \pm 0,07*	0,25 \pm 0,01*	0,21 \pm 0,01*
Toxicidade concentração o ($\mu\text{g/mL}$)		> 100	> 100	> 100	37,5	18,75	9,38
% de macrófagos mortos		0	0	0	100	100	100

*Desvio Padrão

A Figura 17 compara os valores de IC_{50} da DCTN e a Pentamidina frente às amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

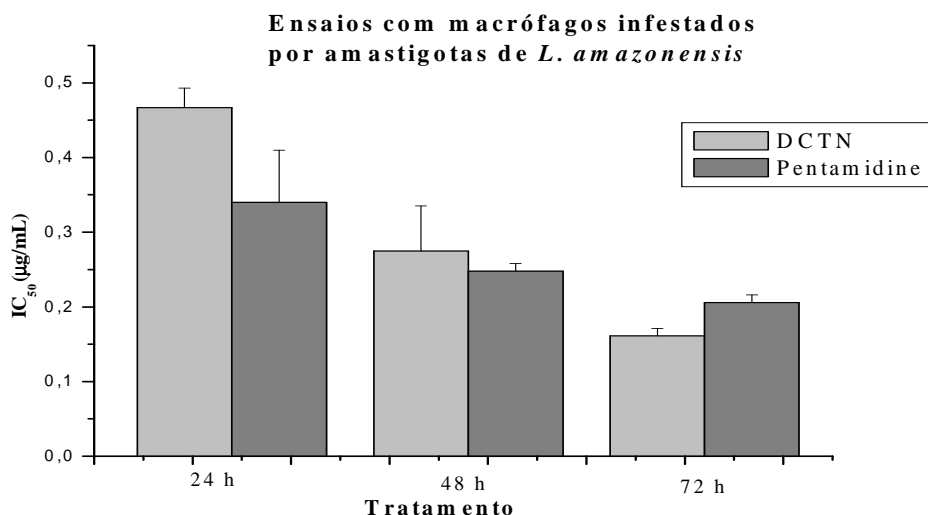


Figura 17: Gráfico de barras comparando os valores de IC_{50} da DCTN e a Pentamidina frente às amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

A avaliação de terpenos isolados do extrato das folhas de *Pourouma guianensis* (Moraceae) foi analisada quanto à atividade inibitória contra as formas promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania amazonensis* (TORRES-SANTOS et al., 2004). Dentre os produtos naturais isolados somente o ácido ursólico e o ácido oleanólico indicaram alta atividade contra amastigotas intracelulares ($\text{IC}_{50} = 27 \mu\text{g/mL}$ e $11 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), sendo esses triterpenos mais ativos que o controle Glucantime ($\text{IC}_{50} = 83 \mu\text{g/mL}$).

Os efeitos antiproliferativos do diterpeno alcaloidal atisina foram analisados contra a *Leishmania infantum* que causa leishmaniose humana e canina no Mediterrâneo. Foram analisados 43 compostos, incluindo alcalóides diterpenoidais C-19 e C-20 e, apenas 15,22-*o*-diacetil-19-oxodiidroatisina, azitina e isoazitina foram altamente ativos contra cultura dos parasitos (forma promastigota). Estes compostos não apresentaram toxicidade nos ensaios com formas amastigotas intracelulares em macrófagos (GONZÁLEZ et al., 2005). A Figura 18 mostra as estruturas químicas e os valores de IC₅₀ em cultura de 24 horas dos diterpenos alcaloidais 15,22-*o*-diacetil-19-oxodiidroatisina, azitina e isoazitina.

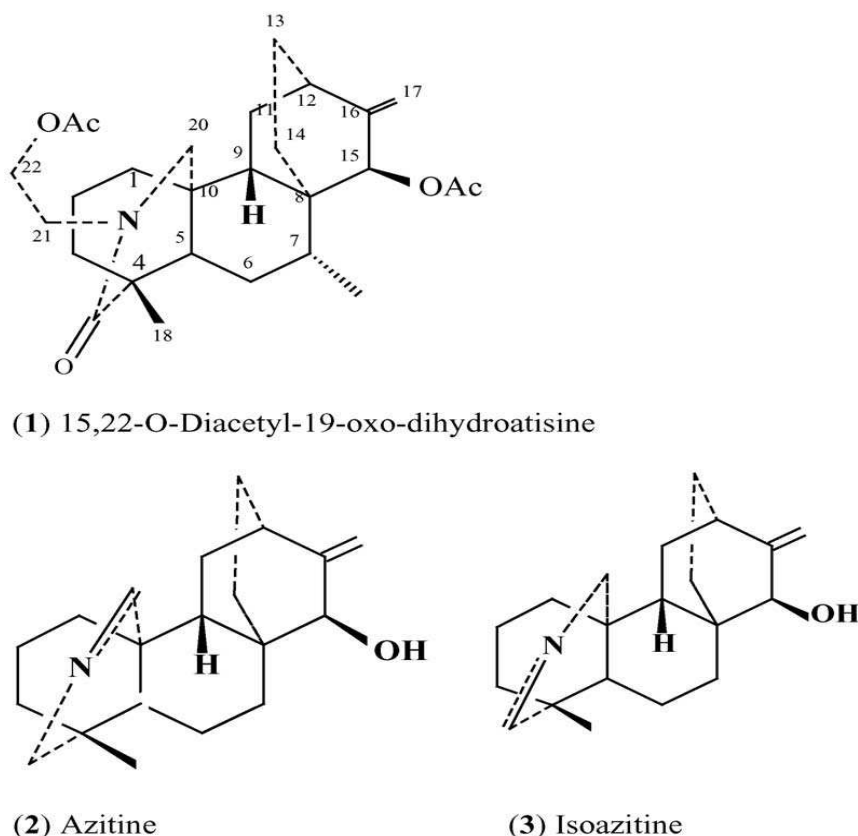


Figura 18. Estruturas químicas e os valores de IC₅₀ dos diterpenos alcaloidais (1) 15,22-*o*-diacetil-19-oxodiidroatisina com IC₅₀ = 24,58 mg/L, (2) azitina com IC₅₀ = 26,30 mg/L e (3) isoazitina IC₅₀ = 13,38 mg/L em ensaios frente a promastigotas de *L. infantum* em culturas de 24 horas.

4.2.3. Atividade anti-leishmania para amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

As formas amastigotas axênicas foram produzidas a partir do cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*. No presente trabalho foram ensaiados frente às amastigotas axênicas os terpenos AAA, DCTN e CTN e as frações F1-7 e F25-27 e do extrato CC-EHA, nas concentrações de 150, 75, 37,5, 18,76, 9,38, 4,69, 2,34, 1,18, 0, 586 µg/mL e, a fração F28 nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 µg/mL. A atividade antiparasitária foi avaliada pela contagem do número de parasitas vivos em câmara de Neubauer e culturas de 24, 48 e 72 horas, e a viabilidade celular das amostras foi avaliada pelo cálculo do IC₅₀. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para os ensaios com as amastigotas axênicas nos diferentes tempos de cultura para todas as amostras testadas e, a Figura 19 mostra a comparação entre os IC₅₀ para os terpenos ensaiados.

Tabela 6. Valores de IC₅₀ para os ensaios frente a amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

	IC ₅₀					
	24 h		48 h		72 h	
	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)
Terpenos						
CTN	58,25 ± 19,2*	184,67	14,83 ± 0,14*	47,02	2,95 ± 0,05*	9,35
DCTN	19,98 ± 0,05*	63,75	12,50 ± 0,08*	39,89	5,63 ± 0,07*	17,96
AAA	41,44 ± 4,83*	88,77	18,49 ± 3,82*	39,61	4,88 ± 0,04*	10,45
Frações	(µg/mL)		(µg/mL)		(µg/mL)	
F 1-7	14,70 ± 0,04*		5,49 ± 0,14*		2,54 ± 0,23*	
F 25-27	12,45 ± 0,71*		8,39 ± 0,25*		4,28 ± 0,16*	
F 28	6,18 ± 0,02*		2,75 ± 0,07*		1,14 ± 0,03*	
Extrato	(µg/mL)		(µg/mL)		(µg/mL)	
CC-EHA	14,74 ± 0,05*		19,17 ± 0,14*		7,12 ± 0,01*	
Pentamidina	25,14 ± 0,06*		20,85 ± 0,03*		13,85 ± 0,08*	

*Desvio Padrão

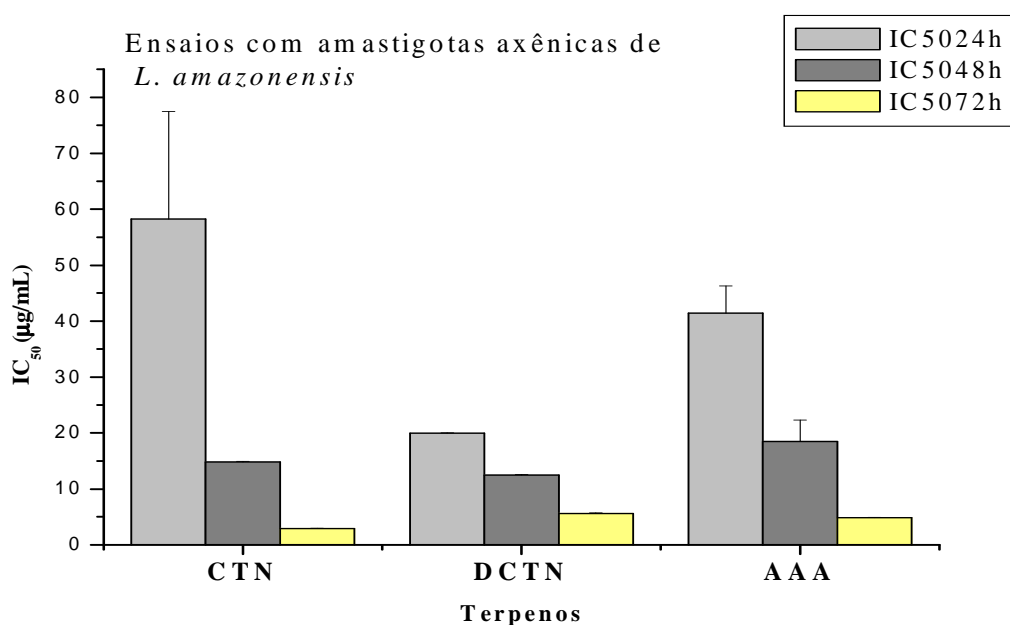


Figura 19: Gráfico de barras comparando os valores de IC₅₀ dos terpenos frente às amastigotas axênicas de *L. amazonensis* nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

Os resultados obtidos nos ensaios mostram que o terpeno **DCTN** com um IC₅₀ de 19,98 µg/mL, foi a amostra mais ativa em 24 horas de cultura frente às amastigotas axênicas correlacionando com a maior atividade frente às promastigotas em cultura de 24 horas. A Tabela 7 mostra a comparação entre os IC₅₀ das amostras frente às amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*. Considerando as frações ensaiadas a **F-28** foi a mais ativa com IC₅₀ = 6,18 ± 0,02 µg/mL.

Tabela 7. Valores de IC₅₀ (µg/mL) de diterpenos **DCTN** e **CTN**, **AAA** triterpeno e do extrato **CC-EHA** contra *L. amazonensis* promastigotas e amastigotas axênicas em 24 h de cultura.

Amostras	IC ₅₀			
	Promastigotas		amastigotas axênicas	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
DCTN	6,30 ± 0,06*	20,1	19,98 ± 0,05*	63,75
AAA	41,70 ± 0,02*	89,3	41,44 ± 4,83*	88,77
CTN	48,00 ± 0,09*	152,2	58,25 ± 19,2*	184,67
CC-EHA	18,00 ± 0,01*	-	14,74 ± 0,05*	-
Pentamidina^a	23,11 ± 0,04*		24,09 ± 0,03*	

^a Substância de referência. * Desvio Padrão

A literatura relata outros estudos químicos e imunofarmacológicos, *in vitro*, que têm sido realizados com a finalidade de encontrar novos compostos pouco citotóxicos, e de maneira econômica viável, seletivos e que sejam uma opção para combater a resistência em tripanossomatídeos causada pelos medicamentos hoje utilizados (FUMAROLA et al., 2004).

O óleo obtido a partir de *Artemisia abyssinica* apresentou um valor de EC₅₀ de 12,44 µg/mL em amastigotas axênicas de *L. aethiopica*, com um índice de seletividade de 28 (TARIKU et al., 2010), enquanto que o óleo de *Artemisia absinthium* mostrou um valor de EC₅₀ de 7,94 µg/mL em amastigotas de axênicas com um índice de seletividade de 19,2 (TARIKU et al., 2011). Outros autores demonstraram atividade em diversas espécies da forma axênica de *L. amazonensis* como em *Himatanthus sucuuba* com um valor de IC₅₀ = 5 µg/mL em amastigotas axênicas de *L. amazonensis* em cultura de 24 horas (CASTILLO et al., 2007). O estudo realizado com o óleo de *Copaifera* spp. comprovou atividade contra as formas, amastigotas axênicas de *L. amazonensis* com um valor de IC₅₀ de 15,0 µg/mL (SANTOS et al., 2008).

4.3. Atividade Anti-chagásica

A avaliação tripanossomicida de *C. cajucara* frente ao *T. cruzi* cepa Y foi realizada para as formas evolutivas de epimastigotas e tripomastigotas em culturas de 24, 48 e 72 h. A avaliação em todos os ensaios foi realizada, no mínimo em triplicata e três ensaios independentes, por contagem dos parasitas vivos e mortos em câmara de Neubauer.

4.3.1. Atividade para tripomastigota em *T. cruzi*

Os produtos naturais isolados **DCTN**, **CTN** e **AAA**, bem como as frações foram inicialmente avaliados frente ao parasito *T. cruzi* na forma evolutiva tripomastigota nas concentrações de 150, 75, 37,5, 18,76, 9,38 µg/mL, com exceção da fração F 28 com concentração até 3,125 µg/mL, em culturas de 24, 48 e 72 h. Os resultados em percentuais de parasitos vivos indicaram que a **DCTN**, da mesma forma que para o parasito do gênero *Leishmania*, mostrou-se como o produto natural isolado mais ativo apresentando na concentração de 9,38 µg/mL apenas 1,96% de parasitos vivos, ou seja, com a morte de 98,04% dos parasitos em 72 h de cultura, sendo mais ativo do que o Benzinidazol usado como controle positivo (IC₅₀ = 7,67µg/mL). A Tabela 8 mostra os resultados obtidos.

Tabela 8. Valores de % de parasitos vivos nos ensaios com **AAA, DCTN, CTN, CC-EHA, F1-7, F25-27 e F28** frente à tripomastigotas de *T. cruzi*.

Substância	Concentração tempo de cultura		
	9,38 µg/ml 24 h	9,38 µg/ml 48 h	9,38 µg/ml 72 h
% Parasitos vivos			
CTN	57,81	28,12	0
AAA	100	62,5	7,81
CC- EHA	95,37	40,89	3,12
F 25-27	80,42	39,28	3,56
F1-7	75,58	36,12	2,56
DCTN	49,25	23,25	1,96
F28	3,125µg/ml 24 h	3,125µg/ml 48 h	3,125µg/ml 72 h
	65,62	37,5	2,03

Assim, devido a intensa atividade observada, os produtos naturais isolados **DCTN, CTN e AAA**, bem como as frações foram novamente avaliados frente ao parasito *T. cruzi* na forma evolutiva tripomastigota em triplicata e dois ensaios independentes durante 24, 48 e 72 h em cultura, nas concentrações em ordem decrescente de 150, 75, 37,5, 18,76, 9,38, 4,69, 2,34, 1,18, 0,586 µg/mL para o extrato bruto **CC-EHA** e para as frações **AAA, DCTN, CTN, F 1-7, F25-27** e para a fração **F 28** nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,38, 0,19 µg/mL diluídas em DMSO estéril. Avaliando os resultados através dos valores de IC_{50} obtidos nos experimentos, pode ser observado que o terpeno **DCTN** com um IC_{50} de 10,17 µg/mL foi a amostra mais ativa em 24 horas de cultura frente às tripomastigotas, sendo também a mais ativa nos tempos de 48 e 72 horas com um IC_{50} de 4,11 e 1,43 µg/mL, respectivamente.

Na Figura 20 observamos o terpeno **DCTN** como o melhor dos produtos naturais isolados para atividade frente à tripomastigota, as frações **CC-EHA, F 1-7 e F 25-27** também apresentaram um resultado significativo com IC_{50} para o tempo de 72 horas de 1,94, 1,35 e 1,11 µg/mL, respectivamente (Figura 21), sendo que para a fração **F 28** os resultados não expressaram valores coerentes.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para os ensaios frente às tripomastigotas de *T. cruzi* para os terpenos e frações de *C. cajucara*.

Tabela 9. Valores de IC₅₀ (concentração de composto necessária para matar 50% ± SD do parasita) de diterpenos **DCTN** e **CTN**, o triterpeno **AAA** e as frações **CC-EHA**, **F 1-7**, **F 25-27** e **F8** contra tripomastigotas de *T. cruzi* em cultura de 24, 48 e 72 h.

Composto	IC ₅₀					
	24 h		48 h		72 h	
	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)
CTN	16,04±0,11*	50,85	4,43±0,03*	14,04	1,94±0,02*	6,15
DCTN	10,17±0,07*	32,45	4,11±0,07*	13,11	1,43±0,02*	4,56
AAA	30,61±0,01*	65,57	14,80±0,06*	31,70	2,30±0,02*	4,93
Frações						
F 1-7	13,98±0,02*		11,35±0,05*		1,35±0,03*	
F 25-27	20,30±0,02*		11,82±0,10*		1,11±0,11*	
F 28	-		-		-	
Extrato						
CC-EHA	26,72±0,04*		6,48±0,06*		1,94±0,02*	
Benznidazol	13,60±0,02*		10,78±0,05*		7,67±0,06*	

*Desvio Padrão

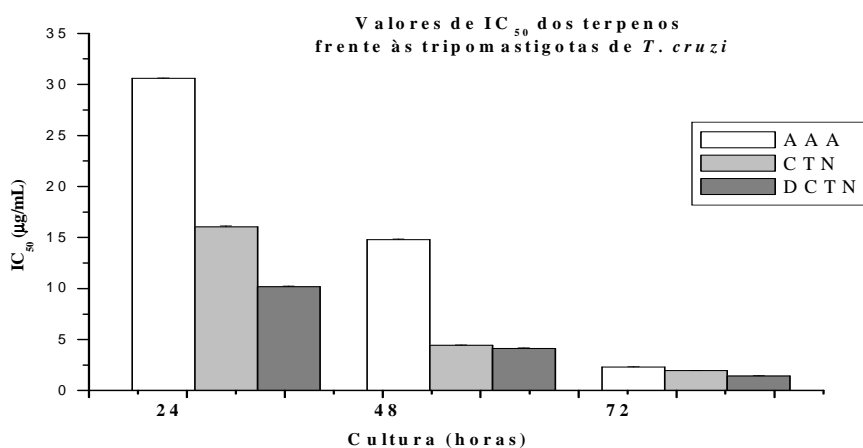


Figura 20: Gráfico de barras comparando os valores de IC₅₀ dos terpenos frente às tripomastigotas de *T. cruzi* nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

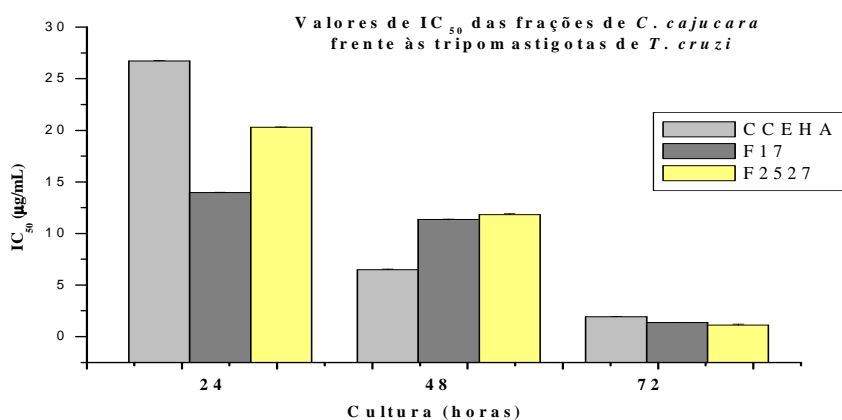


Figura 21: Gráfico de barras comparando os valores de IC₅₀ das frações (F1-7, F25-27) e extrato (CC-EHA) frente às tripomastigotas de *T. cruzi* nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

Tem sido descrito na literatura diversos resultados da avaliação de terpenos frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, como por exemplo, o ácido caurenóico isolado de *Mikania obtusata*, Asteraceae (ALVES et al., 1995), *Xylopiya frutescens*, Annonaceae (TAKAHASHI et al., 1994) e de *Viguiera aspillioides*, Asteraceae (COSTA et al., 1995), apresentam 100% de atividade contra o *T. cruzi*, na concentração de 1000µg/mL de sangue contaminado. O ácido xilópico, diterpeno isolado de *Xylopiya frutescens*, Annonaceae (TAKAHASHI et al., 1994) e o caurenol, isolado de *Viguiera aspillioides*, Asteraceae (COSTA et al., 1995) e de *Xylopiya frutescens*, Annonaceae (TAKAHASHI, et al., 1994), foram ativos nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Os diterpenos 17-hidroxicauranol e o ácido traquilobânico, isolados de *Viguiera aspillioides*, Asteraceae, foram ativos contra *T. cruzi* nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL de sangue contaminado (COSTA et al., 1995). Nascimento et al. (2004) avaliaram as atividades tripanossomicidas *in vitro* de terpenos isolados de *Mikania stipulacea* e *Mikania hoehnei*, espécies de plantas conhecidas como guaco. O diterpeno ácido ent-9 α -hidroxi-15 β -*E*-cinnamoiloxi-16-cauren 19-óico apresentaram atividade contra tripomastigotas, reduzindo o número de parasitas em 61,7, 62,8 e 69,4% nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, respectivamente. O gênero *Mikania* é conhecido por possuir diterpenos caurenos como o ácido caurenóico, que demonstrou atividade parcial contra *T. cruzi*. Das folhas de *Alomia myriadenia*, foram isolados os diterpenos ent-8*S*,12*S*-epoxi-7*R*,16- diidroxihalima-5(10),13-dien-15,16-olídeo, ent-16-hidroxilabda-7,13-dien-15,16-olídeo e ent-12*R*hidroxilabda- 7,13-dien-15,16-olídeo. Da avaliação destes três diterpenos, o último foi mais ativo, quando testado *in vitro* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* em sangue infectado de murinos, causando a lise de 100% dos parasitas na concentração de 250 µg/mL (SCIO et al., 2003).

4.3.2. Atividade para epimastigota para *T. cruzi*

As amostras foram também avaliadas para atividade anti-tripanosômica frente ao *T. cruzi* na forma evolutiva de epimastigotas. Inicialmente, foram feitos ensaios concentrações de 150, 75, 37,5, 18,76, 9,38 µg/mL para AAA, DCTN, CTN, CC-EHA, F 1-7, F25-27 e, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL para F 28 em culturas de 24, 48 e 72 h. Os resultados indicaram que na concentração de 37,5 µg/mL os diterpenos DCTN e CTN, e o triterpeno AAA inibiram o crescimento dos parasitas na faixa em 33,81, 18, e 27,86%, respectivamente de forma dependente da dose. As Tabelas 10, 11, 12 mostram os resultados obtidos.

Tabela 10. Valores de % de parasitos vivos (µg/mL) de AAA, DCTN, CTN, CC-EHA, F1-7, F25-27 e F28 frente a *T.cruzi epimastigota 24 horas*

Amostra	Concentração (µg/mL)				
	9,38	18,76	37,5	75	150
	(%)				
CTN	73,42	35,15	18,0	8,57	0
DCTN	77,84	63,13	33,81	0	0
CC- EHA	53,44	24,13	21,37	0	0
F 25-27	57,84	38,49	0	0	0
F1- 7	43,06	21,94	9,86	0	0
AAA	75,45	58,67	27,86	0	0
	3,125	6,25	12,5	25	50
F 28	67,34	59,07	43,88	26,89	0

Tabela 11. Valores de % de parasitos vivos ($\mu\text{g/mL}$) de **AAA, DCTN, CTN, CC-EHA, F1-7, F25-27 e F28** frente a *T.cruzi epimastigota* 48 horas

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)				
	9,38	18,76	37,5	75	150
	(%)				
CTN	41,99	25,89	2,60	0	0
DCTN	38,33	27,94	12,65	0	0
CC- EHA	30,54	15,84	5,87	0	0
F 25-27	23,06	5,75	1,48	0	0
F1- 7	28,77	12,87	0	0	0
AAA	35,38	16,32	8,95	0	0
	3,125	6,25	12,5	25	50
F 28	28,44	15,53	5,60	0	0

Tabela 12. Valores de % de parasitos vivos ($\mu\text{g/mL}$) de **AAA, DCTN, CTN, CC-EHA, F1-7, F25-27 e F28** frente a *T.cruzi epimastigota* 72 horas

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)				
	9,38	18,76	37,5	75	150
	(%)				
CTN	5,44	0	0	0	0
DCTN	3,21	0	0	0	0
CC- EHA	0	0	0	0	0
F 25-27	2,78	0	0	0	0
F1- 7	0	0	0	0	0
AAA	1,52	0	0	0	0
	3,125	6,25	12,5	25	50
F 28	3,60	1,44	0	0	0

Posteriormente, foram realizados novos ensaios em faixa de concentração de 150 a 0,586 $\mu\text{g/mL}$ em culturas de 24, 48 e 72 h para **AAA, DCTN, CTN**, e as frações **F 1-7, F25-27** e o extrato bruto **CC-EHA** e para a fração **F28** na faixa de 50 a 0,19 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em DMSO estéril. Analisando os resultados obtidos em valores de IC_{50} observamos que as substâncias isoladas obtiveram resultados mais significativos em comparação as frações que possuem diversos componentes em suas composições. Na tabela 13 observamos o terpeno **CTN** como o mais ativo dos produtos naturais isolados para atividade frente à epimastigota com um valor $\text{IC}_{50} = 1,19 \mu\text{g/mL}$ em cultura de 72 h, a **DCTN** não teve o mesmo desempenho em relação forma tripomastigota, mesmo assim os resultados mostraram valor $\text{IC}_{50} = 1,69 \mu\text{g/mL}$. As frações, **F 1-7** e **F 25-27** e o extrato bruto **CC-EHA** também apresentaram resultados significativos com IC_{50} para o tempo de 72 h de 1,94, 1,35 e 1,11 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto que para a fração **F 28** os resultados não expressaram valores coerentes. As Figuras 22 e 23 mostram os resultados comparativos para os terpenos e frações frente às epimastigotas de *T. cruzi*.

Tabela 13. Valores de IC₅₀ para os ensaios de epimastigotas de *T. cruzi*

Composto	IC ₅₀		
	24 h	48 h	72 h
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
CTN	19,51±0,06*	4,00±0,4*	1,19±0,18*
DCTN	23,57±0,16*	4,02±0,25*	1,69±0,06*
AAA	23,66±0,05*	2,29±0,39*	2,48±0,08*
Frações			
F 1-7	7,61±0,06*	1,97±0,33*	-
F 25-27	11,78±0,16*	6,43±0,01*	1,77±0,04*
F 28	-	-	-
Extrato			
CC-EHA	13,74±0,30*	5,93±0,02*	1,59±0,03*

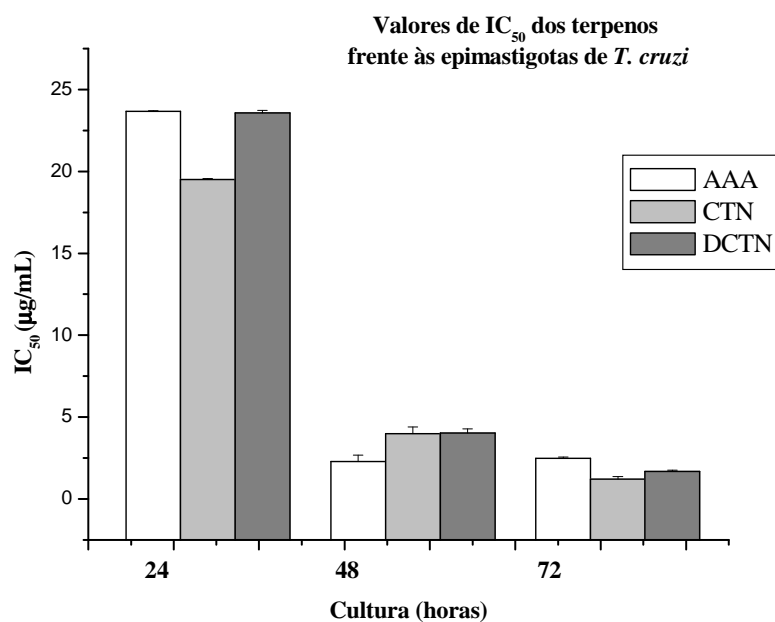


Figura 22: Gráfico de barras comparando os valores de IC₅₀ dos terpenos frente às epimastigotas de *T. cruzi* nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

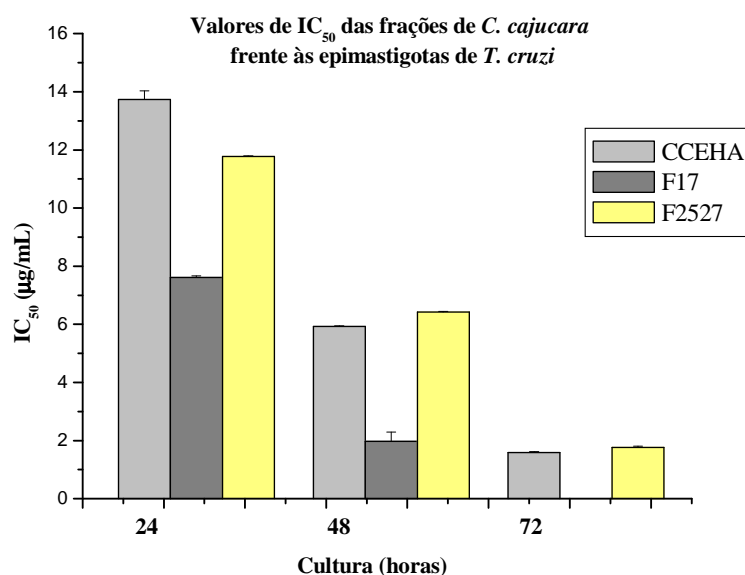


Figura 23: Gráfico de barras comparando os valores de IC₅₀ das frações (F1-7, F25-27) e extrato (CC-EHA) frente às epimastigotas de *T. cruzi* nos ensaios de 24, 48 e 72 horas.

O efeito tripanossomicida dos compostos isolados das espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas epimastigotas dentre eles o taxol, um diterpeno com atividade antitumoral, isolado de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), foi ativo, interferindo na proliferação dos epimastigotas, impedindo que a divisão celular se completasse permitindo a multiplicação de organelas. O triterpeno tingenona, também extraído da mesma espécie, foi ativo contra epimastigotas, causando inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos no *T. cruzi* (CASTRO, 1993).

A espécie *Dracocephalum komarovi* Lipsky (Labiatae) é bastante utilizada no Uzbequistão na forma de chá para terapêutica de doenças inflamatórias. Desta espécie foram isolados os diterpenos komarovispirona, dracocequinonas A e B que foram ativos contra epimastigotas com concentração letal mínima de 23, 12,5 e 25 µM, respectivamente (UCHIYAMA et al., 2004).

4.4. Avaliação da Citotoxicidade em Células THP-1

A linhagem celular THP-1 foi estabelecida por Tsuchiya et al. (1980) a partir de blastos do sangue de um garoto de 1 ano diagnosticado com leucemia monocítica aguda. Esta linhagem é amplamente usada como modelo experimental em estudos *in vitro* para identificação de novas substâncias com potencial atividade biológica (BANDERALI et al., 2011).

O teste de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tem se tornado importante para a avaliação de produtos naturais, sendo também muito utilizado como método alternativo aos testes farmacológicos reduzido a experimentação *in vivo* em animais (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; CINGI et al., 1991). O uso de culturas de células tem se tornado um modelo muito empregado, pois são reprodutíveis, sensíveis e rápidos (ROGERO et al., 2003).

Esta linhagem celular também é um modelo bem estabelecido para estudos toxicológicos (MULLER et al., 2003; CORSINI et al., 2011), imunológicos (SMIDERLE et al., 2011) e “screening” para substâncias antileishmania (GEBRE-HIWOT et al., 1992).

Os produtos naturais isolados e as frações ensaiadas frente aos parasitos tripanossomatídeos foram também, ensaiados frente a células normais de origem humana, THP-1, para avaliação da toxicidade dessas amostras. Os resultados demonstraram IC₅₀ com valores significativos, sendo que para a **DCTN** de 56,95 µg/mL bem superior aos valores de IC₅₀ obtidos frente a *L. amazonensis* e *T. cruzi*. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para os valores de IC₅₀ frente a linhagem THP-1.

Tabela 14. Valores de IC₅₀ para os ensaios com as células da linhagem THP-1 para culturas de 24 horas.

Amostra	IC₅₀ (µg/mL)	Coefficiente de correlação (R)
AAA	75,80	0,99946
CTN	74,40	0,99999
DCTN	56,95	0,99756
F 25-27	36,24	0,99918
F 28	40,10	0,99767
F 1-7	2,10	0,99942

^aCoefficiente de correlação da equação da reta usada para o cálculo do IC₅₀.

4.5. Investigação dos Possíveis Mecanismos de Ação dos Terpenos

4.5.1. Avaliação da ação dos metabólitos especiais na biossíntese do ergosterol

Acredita-se que os tripanossomatídeos não dependam da utilização do esteroide colesterol exógeno para sua sobrevivência; uma vez que sintetiza seus próprios esteróis. Apesar disso, um percentual expressivo de colesterol é encontrado em suas membranas sendo em alguns casos o esteroide majoritário indicando um papel biológico para essa molécula.

Os ensaios para avaliação dos possíveis efeitos na biossíntese do ergosterol foram realizados utilizando-se o conteúdo lipídico total obtido a partir de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com os produtos naturais **DCTN** e **AAA**. As concentrações dos terpenos foram utilizadas tomando como base os valores dos IC₅₀ apresentados anteriormente nos ensaios da atividade anti-leishmania. A avaliação foi realizada utilizando-se a técnica da cromatografia em camada fina em placas de gel de sílica. A Figura 24 mostra a fotografia da placa de cromatografia em camada fina com os resultados obtidos.

Observando-se a Figura 24 podemos sugerir que o padrão de biossíntese dos lipídeos, em especial do ergosterol, foi modificado indicando que houve pequena interferência dos produtos naturais demonstrando que não é a via principal da atuação desses terpenos. Este ensaio foi realizado pela similaridade na estrutura do **AAA** com o ergosterol e a **DCTN** foi testada por se o terpeno que apresentou resultados mais significativos. A Figura 25 mostra as estruturas químicas dos esteróides ergosterol e colesterol, bem como dos terpenos **DCTN** e **AAA** para uma simples analogia molecular. Parasitas do gênero *Leishmania* sintetizam esteróides específicos e imprescindíveis para o desenvolvimento e viabilidade celular, sendo o ergosterol o principal (GAUGHAN et al., 1995; WANG et al., 1997). Existem determinadas enzimas indispensáveis à síntese dos ergostanos, que podem ser inibidas ou reguladas por fármacos. Contudo, a resposta clínica frente ao tratamento com essa classe de fármacos depende do tipo de *Leishmania*.

4.5.2. Avaliação do efeito inibitório da enzima tripanotona redutase

Os compostos a partir de fontes naturais, têm sido investigados como inibidores seletivos da tripanotona redutase (GALLO, et al., 2008). Tripanossomatídeos possuem um metabolismo do grupo tiol único, envolvendo a tripanotona, que desempenha um papel crucial na regulação do equilíbrio redox e na defesa contra o estresse oxidativo em um caminho não compartilhado pelo hospedeiro humano (revisado em MÜLLER et al. , 2003). Esta enzima mantém a tripanotona em sua forma reduzida e assim capaz de ser oxidada para tripanotona oxidase, levando a redução dos níveis de radicais livres e contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor (HEBY, et al., 2007).

No presente estudo, investigamos o efeito dos produtos naturais **DCTN**, **CTN** e **AAA**, que apresentaram atividade leishmanicida significativa, na via da enzima tripanotona redutase de *L. amazonensis* em promastigotas. Os ensaios foram realizados utilizando o protocolo de Moreno e colaboradores (1994) que considera o consumo de NADPH, que é co-fator do substrato da enzima a tripanotona. Os controles utilizados nos ensaios foram o extrato de promastigotas de *L. amazonensis* na ausência e presença da tripanotona e, na presença dos terpenos.

Os diterpenos **CTN** (Figura 26), **DCTN** (Figura 27), apresentaram atividade inibitória sobre a via de tripanotona redutase através da maior leitura de NADPH indicando seu consumo demonstrando inibição enzimática sobre esta via, o triterpeno **AAA** (Figura 28) tal como observado para os diterpenos, também apresentou atividade inibitória. Estes resultados mostraram essas substâncias tem participação na via da tripanotona redutase.

A atividade de inibição de produtos naturais isolados de plantas, também foi descrita por diversos autores sobre a via da tripanotona redutase (FOURNET et al.,1998). Macarri e colaboradores (2011), em seus estudos consideram a tripanotona redutase como um dos principais alvos enzimáticos para o desenho de fármacos, cujo objetivo é o tratamento de tripanossomatídeos.

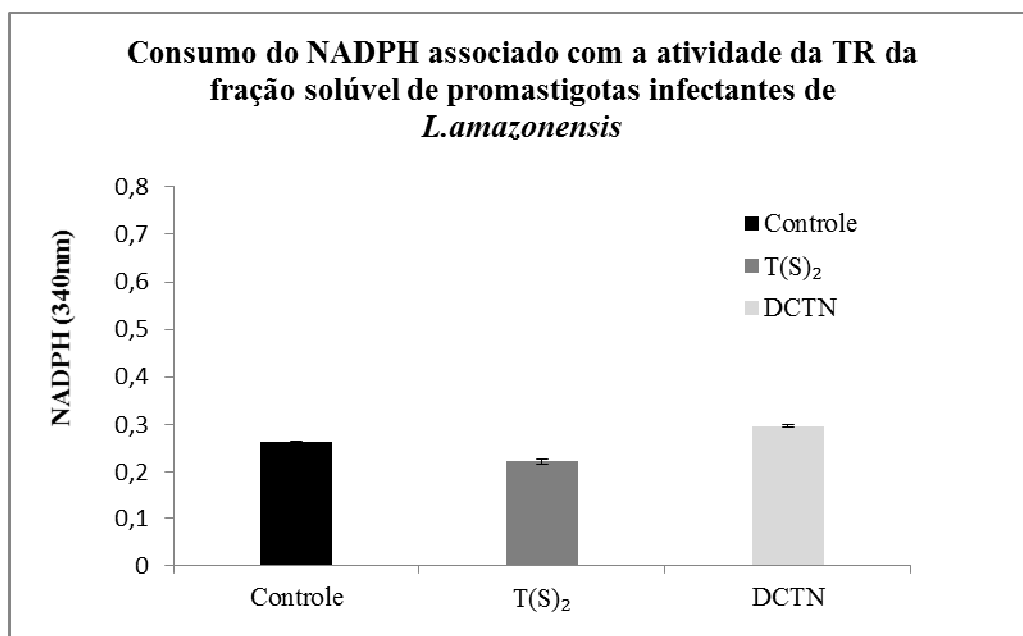


Figura 26. Efeito do **DCTN** sobre a via tripanotona redutase em promastigotas de *L. amazonensis*. Avaliado através da leitura da densidade ótica do NADPH.

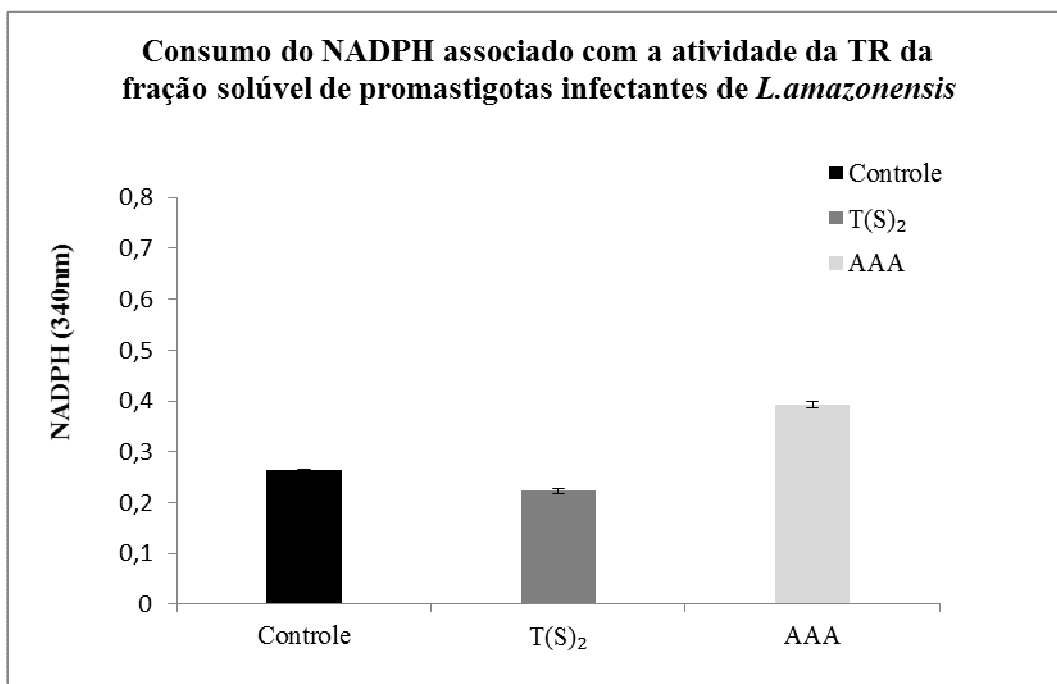


Figura 27. Efeito do AAA sobre a via tripanotona redutase em promastigotas de *L. amazonensis*. Avaliado através da leitura da densidade ótica do NADPH.

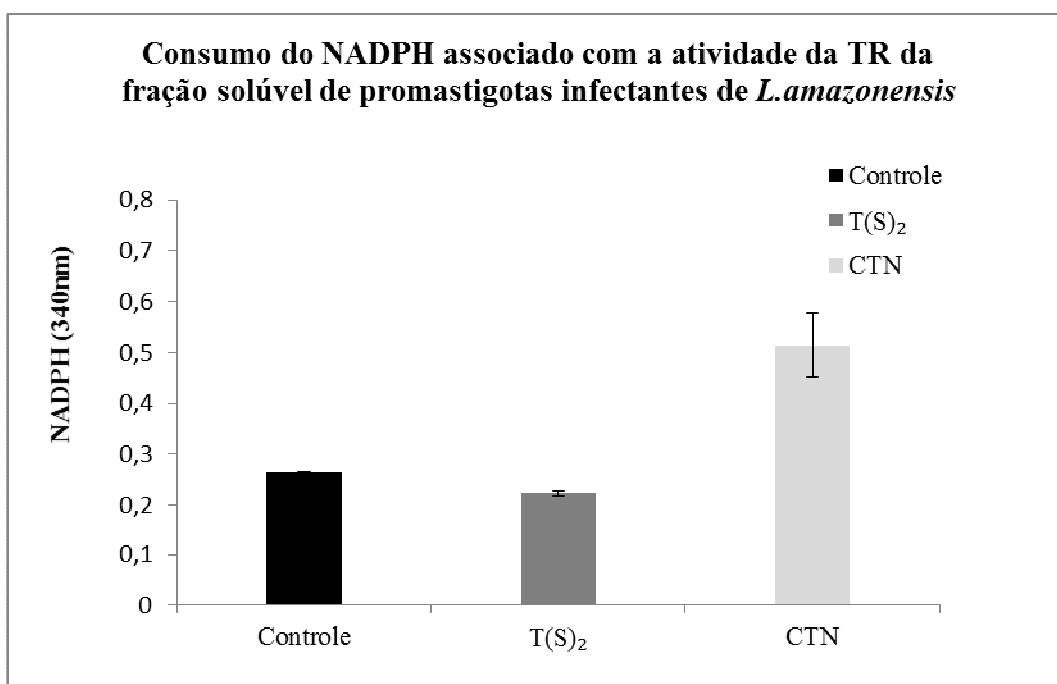


Figura 28. Efeito do CTN sobre a via tripanotona redutase em promastigotas de *L. amazonensis*. Avaliado através da leitura da densidade ótica do NADPH.

5. CONCLUSÕES

O estudo realizado com frações e os terpenos isolados da espécie *C. cajucara*, planta da região amazônica e usada na medicina popular da região, mostrou a importante ação dessas substâncias e da própria espécie vegetal como agente antiparasitário.

Dentre os terpenos estudados a **DCTN** foi o mais ativo tanto para as formas promastigotas e amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Nos ensaios frente às amastigotas intracelulares ficou evidenciado que a **DCTN** é muito menos tóxica do que a Pentamidina, usada em tratamento clínico e, mais eficiente, com $IC_{50} = 0,16$ $\mu\text{g/mL}$ nas culturas de 72 horas.

Em relação às frações ensaiadas frente à amastigotas axênicas a fração **F 28** foi a mais ativa com $IC_{50} = 6,18$ $\mu\text{g/mL}$ em culturas de 24 horas, sugerindo que a presença dos diterpenos *cis* e *trans*-cajucarinas **B**, pode ser relevante para a atividade leishmanicida.

Na investigação do possível mecanismo de ação dos terpenos mais ativos frente a *L. amazonensis* foi possível sugerir que a inibição da biossíntese do ergosterol não é uma via importante para a ação dessas substâncias. No entanto, a avaliação da via da enzima tripanotiona redutase indica ser um dos possíveis mecanismos da ação antileishmania para os terpenos avaliados.

Na avaliação da atividade frente ao *T. cruzi*, os diterpenos **DCTN** e **CTN** foram os mais ativos, tanto nas formas tripomastigotas quanto nas epimastigotas, com valores de IC_{50} muito próximos, sendo a **DCTN** mais ativa para tripomastigotas ($IC_{50} = 10,17$ $\mu\text{g/mL}$ em cultura de 24 horas) e a **CTN** mais ativa para epimastigotas ($IC_{50} = 16,04$ $\mu\text{g/mL}$ em cultura de 24 horas). O triterpeno **AAA** foi menos ativo, mas também mostrou atividade significativa para as formas ensaiadas.

As frações, **F 1-7** e **F 25-27** e o extrato **CC-EHA** quando comparados com o controle também apresentaram resultados significativos frente às tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, com valores de IC_{50} na faixa de 7,61 a 13,74 e 13,98 a 26,72 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

As substâncias estudadas mostraram-se promissoras para estudos mais detalhados visando novos agentes leishmanicidas e tripanossomicidas, uma vez que apresentaram atividades específicas muito significativas.

De maneira geral, os resultados obtidos indicaram o diterpeno **DCTN** como uma substância que poderá atuar como agente leishmanicida e tripanossomicida.

Será necessária a continuação dos experimentos através de ensaios *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; NAGAFUGI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J, HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol. Pharm. Bull.** 25: 1188-1191, 2002.
- ABREU, A.S.; BARBOSA, P.S.; MÜLLER, A.H.; GUILHON, G.M.S. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei var Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica UFPA**, 1: 1-9, 2001.
- AKENDENGUE B.; NGOU-MILAMA E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite** 6: 3-8. 1999
- ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T.J.; MURTA, S. M. F.; CERAVOLO, I.P. ROMANHA, A. J.; ZANI, C.L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med**, 61: 85-87, 1995.
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol.** 21: 462-468, 2005.
- ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V. & LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry** 49: 751-754, 1998.
- AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira** 20: 185-194, 2006.
- BAGALKOTKAR, G.; SAGINEEDU, S.R.; SAADJ, M.S. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn and their pharmacological properties, **J. Pharm. Pharmacol.** 58: 1559-70, 2006.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food Chem. Toxicol.** 46: 446–475, 2008.
- BAILLON, H. Étude generale du groupe des Euphorbiacees. **Victor Masson**, Paris, 1858.
- BANDERALI, U.; BELKE, D.; SINGH, A.; JAYANTHAN, A.; GILES, W. R.; NARENDRAN, A. Curcumin blocks Kv11.1 (erg) potassium current and slows proliferation in the infant acute monocytic leukemia cell line THP-1. **Cell. Physiol. Biochem.** 28, 1169–1180, 2011.
- BANI, S., KAUL, A.; KHAN, B.; GUPTA, V.K.; SATTI, N.K.; SURI, K.A. QAZI, G. N. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. **J. Ethnopharmacol.** 110: 92-98, 2007.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S., FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A. CROFT, S. L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry** 55: 89-595, 2000.

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; AZEVEDO JR., W.F.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 100: 575-606, 2005.

BENTHAM, G. Note on Euphorbiaceae. **Botan. J. Linnean Soc.** 37: 185-267, 1880.

BERG, M.E.V.D. Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático. 2a Edição. **Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém**, pág. 58-61, 117, 118, 132, 133, 1993.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37: 911-917, 1959.

BORASCHI, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Urbana no Brasil. **Clin. Vet.** 71: 44 – 48, 2007.

BOIBESSOT, I.; TURNER, C.M.; WATSON, D.G.; GOLDIE, E.; CONNELL, G., MCINTOSH, A.; GRANT, M.H.; SKELLERN, G.G. Metabolism and distribution of phenanthridine trypanocides in *Trypanosoma brucei*. **Acta Trop.** 84: 219-228, 2002.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.M.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol.** 111: 396-402, 2007.

BRASIL. Diário oficial da União. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Decreto 5813 de 22 de junho de 2006. Disponível em <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=2268&Word>

BRASIL. Ministério da Saúde. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de medicamentos.** Brasília, 2006.

BRENER, Z.; ANDRADE A.; BARRAL-NETTO M. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2ªEd, **Guanabara Koogan**, 2000.

BRUN, R.; BUHLER, Y.; SANDMEIER, U.; KAMINSKI, R.; BACHI, C.J.; RATTENDI, D.; LANE, S.; CROFT, S.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V.; CARAVATTI, G.; FREI, J.; STANEK, J.; METT, H. *In vitro* trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40: 1442-1447, 1996.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.** 14: 401-418, 2000.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, L.S.; KIRBY, G.C., WARHURST, D.C. & SOLIS, P.N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry** 56: 203-210, 2000.

CAMPOS, M.C.; SALOMÃO, K.; CASTRO-PINTO, D.B.; LEON, L.L.; BARBOSA, H.S.; MACIEL, M.A., DE CASTRO SL. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res.** 107:1193-204, 2010.

CARREIRA J.C.A.; DA SILVA A.V.M.; PITA-PEREIRA, D.; BRAZIL R.P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors.** 5: 111, 2012.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia.** 72: 599-618, 2001.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J, L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **J. Ethnopharmacol.** 112: 410-414, 2007.

CASTRO, S. L. The challenge of Chagas'disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica.** 53: 83-98, 1993.

CASTRO-PINTO, D. B.; ECHEVARRIA, A.; GENESTRA, M. S; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. **J. Enz. Inhib. Med. Chem.** 19: 57-63, 2004.

CASTRO-PINTO, D. B.; GENESTRA, M.; MENEZES, G. B.; WAGHABI, M.; GONCALVES, A.; DE NIGRIS DEL CISTIA, C.; SANT'ANNA, C. M.; LEON, L. L.; MENDONCA-LIMA, L. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. **Arch. Microbiol.** 189: 375-384, 2008.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1(2): 159-218, 1909.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **Royal Soc. Chem.** 18: 674-688, 2001.

CINGI, M. R.; ANGELIS I.; FORTUNATI, E.; REGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F.. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicity: a multicentre approach. **Toxicol Vitro** 5: 129-125, 1991.

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochem. Rev.** 10: 245-260, 2011.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** 17: 463-482, 2005.

CORSINI, E.; AVOGADRO, A.; GALBIATI, V.; DELL'AGLI, M.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; GERMOLEC, D.R. *In vitro* evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n. 2, p. 108–116, 2011.

COSTA, F. B.; VICHNEWISK, W.; ALBUQUERQUE, S. Terpenóides bioativos de *Viguiera aspilioides* Gardn. (*Asteraceae*) com atividade tripanossomicida. **18ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, 1995.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**. 465: S6-S7, 2010.

COURA J. R.; DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 97: 3-24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 104: 7, 2009.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitol**. 19: 502-508, 2003.

CROTEAU, R.; KUTCAHN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* eds. Rockville, MD: **American Society of Plant Physiologists**. 1250–1318, 2000.

CYSNE-FINKELSTEIN L.; TEMPORAL R. M.; ALVES F. A.; LEON L. L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp. Parasitol**. 89: 58-62, 1998.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**. 45: 419-421, 1954.

DIAS, J. C. P. Chagas disease control and the natural history of human Chagas disease: a possible interaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 95 S. II: 14-20, 2000.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saude Publica**, v. 22, n.10, p. 2020-2021, 2006.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 28(2):81-87, 2006.

DO CAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Pharm. Design** 7: 1157-1164, 2001.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBA, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat. Prod. Rep**. 23: 394-411, 2006.

FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** 2: 187-98, 1985.

FOURNET, A.; BARRIOS A.A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER & CAVÉ A.; Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *Leishmania venezuelensis*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 43: 219-222, 1992.

FOURNET, A, INCHAUSTI, A, YALUFF, G, ROJAS, DE ARIAS, A, GUINAUDEAU, H, BRUNETON, J, BREIDENBACH, M.A, KARPLUS PA, FAERMAN C, H. Trypanocidal bisbenzylisoquinoline alkaloids are inhibitors of trypanothione reductase. **J. Enz. Inhib.** 13: 1-9, 1998.

FOURNET, A.; ANGELO B. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A B. J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *An-timicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 859-863, 1993.

FOURNET, A.; GANTIER, J. C.; GAUTHERET, L.; LEYSALLES, M. H.; MUNOS, J.; MAYRARGUES, H.; MOSKOWITZ, R.; CAVÉ, A. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in Balb/c mice infected with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemoth* 33: 537-544, 1994.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ROJAS DE ARIAS, A.; TORRES DE ORTIZ, S.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. In vitro efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemoth** 40: 2447-2451, 1996.

FREITAS, T.P.T.; D'ANDREA, P.S.; DE PAULA, D.A.J.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BONVICIO, CR.; DE ALMEIDA, A.B.P.F.; BOA-SORTE, E.C.; SOUZA, V.R.F. Natural Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* Captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 12: 81-83, 2012.

FUMAGALI, E.; GONCALVES, R.A.C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B. Produção de metabolitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos generos *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18: 627-641, 2008.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONÍSIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* sp. **Res. Microbiol.** 155: 224-230, 2004.

GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**, India: New India Publishing Agency, p. 139-168, 2008.

GAUGHAN, D.J.; STEEL, D.M.; WHITEHEAD, A.S. Ribozyme mediated cleavage of acute phase serum amyloid A (A-SAA) mRNA *in vitro*. **FEBS Lett.** 374: 241-5, 1995.

GIAROLLA, J.; RANDO, D.J.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular Modeling as a Promising Tool to Study Dendrimer Prodrugs Delivery. **J. Mol. Struct.** 939: 133-139, 2010.

GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G.; CROFT, S. L.; FROMMEL, D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta Trop.** v. 51, n. 3-4, p. 237-245, 1992.

GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose tegumentar americana. Parasitologia Humana (11a Ed). Sao Paulo: **Atheneu**, p.47-64, 2005.

GOMES-CARDOSO, L.; ECHEVARRIA, A.; AGUIARALVES, F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; CANTO CAVALHEIRO, M. M.; GENESTRA, M. S.; LEON L. L. The effect of methoxy-amidine on *Leishmania amazonensis* associated to the trypanotione reductase activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 93: 312, 1998.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.** 7: 338-49, 2004.

GONZÁLEZ, P.; MARÍN, C.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; HITOS, A. B., ROSALES, M. J.; REINA, M.; DÍAZ, J. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes an intracellular of *Leishmania infantum*. **Int. J. Antimicrob. Agents** 25:136-41, 2005.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry** v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. **Amino Acids** 33: 359-66, 2007.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas. São Paulo: **Graficars**, 1935.

IGWEH, A.C.; AGUIYI, J.C.; OKWUASABA, F.K. Antitrypanosomal effects of the aqueous extract of *Brassica oleracea*. **Fitoterapia** 73: 17-21, 2002.

ITOKAWA, H.; SHI, Q.; AKIYAMA, T.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; LEE, K.H. Recent advances in the investigation of curcuminoids. **Chin. Med.** 3:11, 2008.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASH, M. KOMIYAMA, K. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycoesteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **J. Nat. Prod.** 61: 1332-1336, 1997.

KARUNA, R.; REDDY, S.S.; BASKAR, R.; SARALAKUMARI, D. Antioxidant potential of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* in rats. **Indian J. Pharmacol.** 41: 64-67, 2009.

KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected tropical diseases: infection, modeling and control. **J Health Care Poor Underserved** 21:53-69, 2010. doi:10.1353/hpu.0.0270 PMID:20173255.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L., In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica** 77: 307-314, 2000.

KETTER, H.; MARJANOVIC, S.; **Nature Rev. Drug Discov.** 3: 171, 2004.

KRAUTH-SIEGEL, R.; SCHONECK, R. Trypanothione and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. **FASEB J.** 9: 1138-1146, 1995.

LAGE, H.; DUARTE, N.; COBURGER, C.; HILGEROTH, A.; FERREIRA MJ, Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, 17: 441-448, 2009.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 7: 569, 1983.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82: 421-424, 1987.

LAINSON, R.; J.J.; SHAW. New World Leishmaniasis -The Neotropical *Leishmania* species, p. 242-266. In: Cox, F.E.G., J.P. Kreier & D. Wakelin (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. **Parasitology**, 701p, 1998.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Parasitologia Humana.10. ed. São Paulo: **Atheneu**, p. 85 -108, 2000.

LEOPOLDO, P.T.; MACHADO, P.R.; ALMEIDA. R.P.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE JESUS A.R.; H.O. J.L, GUIMARAES, L.H.; BACELLAR, O.; CARVALHO E.M. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infect. Dis.** 25:75-80, 2006.

LINNAEUS, C. Species *Plantarum* 2. *Laurentius Salvius*, **Stockholm**, 1753.

LUZ, Z.M.P.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.L.V.; FIÚZA, V.O.; RABELLO, A.L. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 34: 249-254, 2001.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO. Effects of medicinalplant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Cien. Farm.** 41: 85-94, 2005.

MACCARI, G.; JAEGER, TIMO; MORACA, F.; BIAVA, M.; FLOHÉ, L.; BOTTA, M. A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 21: 5255, 2011.

MACHADO, M.; PIRES, P., DINIS, A. M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Exp. Parasitol.** 130: 223-231, 2012.

MACIEL, M.A.M.; ECHEVARRIA, A.; VEIGA JR, V. F.; PINTO, A.C. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quím. Nova**, 25: 429, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; SILVA, M.N. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry** 49: 823-828, 1998a.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; BRABO, S.N.; ARRUDA, A.C. Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados das cascas do caule de *Croton cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. **Rev. Univ. Rural, Sér Ciênc Exatas e da Terra** 18/20: 17-34, 1998b.

MACIEL, M.A.M.; CASTRO-DANTAS. T.N.; CÂMARA, J.K.P.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.R.; V.F, KAISER, C.; PEREIRA, N.A.; CARNEIRO, C.M.T.S.; ANDERLINDE F.A.; LAPA, A.J.; AGNER, A.R.; CÓLLUS, I.M.S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; GRYNBERG, N.F.; ESTEVES-SOUZA, A.; PISSINATE, K.; ECHEVARRIA, A. Pharmacological and biochemical profiling of lead compounds from traditional remedies: the case of *Croton cajucara*. In: **Advances in Phytomedicine** (vol. 2) (Lead molecules from natural products, Discovery and New Trends; Eds. Khan, M. T. H., Ather, A.), chapter 14, pp 229-257, 2006.

MACIEL, M.A.M.; MARTINS, J.R.; PINTO, A.C.; KAISER, C.R.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human k562 leukemia cells. **J. Braz. Chem. Soc.** 18: 391-396, 2007.

MAHAIO U.V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **J. Nat. Prod.** 58: 324-328, 1995.

MANNA, L.; REALE, S.; PICILLO, E.; VITALE, F.; ELIO, GRAVINO, A.E. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction-based diagnosis of canine leishmaniasis. **J. Vet. Diagn. Invest.** 20: 64-67, 2008.

MARCELINO, A.P.; FERREIRA, E.C.; AVENDANHA, J.S.; COSTA, C.F.; CHIARELLI D, ALMEIDA G, MOREIRA E.C, LEITE RC, REIS J.K.P, GONTIJO C.M.F. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Rev. Parasitol.** 183: 54-58, 2011.

MARZOCHI, M. C. A.; TEIXEIRA, P. C.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, N. F.; COUTINHO, W. BRITO, D. B., Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 35: 301-303, 1993.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidem. Infec.** 136: 9, 2007.

MELOS, J.L.R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos, **Rev. Virtual Quim.**, 4 (4), 374-392, 2012.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: **Parasitologia humana**. Neves, D. P. (ed.). 11. ed. São Paulo, Atheneu., p.67-83, 2005.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *leishmania*. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 2005. P.47-p. 41-p. 46.

MULLER G, ROSNER H, ROHRMANN B, ERLER W, GESCHWEND G, GRAFE U, BURKERT B, MOLLER U, DILLER R, SACHSE K. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. **Toxicology**.184(1):69–82, 2003.

MISHRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* in *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **J. Med. Microbiol**. 58: 1058-66, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. **Brasília**; 2006.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A. K. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sci**. 63: 1823-1834, 1998.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 98(5): 577-591, 2003.

MORENO, S. N. J.; CARNIERI. E. G. S.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by crystal violet. **Mol Biochem Parasitol**. 67: 313- 320, 1994.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO. Produtos Naturais estudos químicos e biológicos. Fortaleza: **Ed. UECE**, 2007.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res**. 86: 999, 2000.

MUELLER, J. Euphorbiaceae. **Linnaea**. 34: 77-142. 1865.

MUELLER, J. *Croton*. In Candolle, A. P. (ed.). Prodrômus systematis naturalis regni vegetabilis. **Victor Masson** 15: 511-708, 1866.

MUELLER, J. *Croton*. In Martius, C.F.P. & Eichler, A.G. (eds.). **Flora brasiliensis**, Fleischer, Lipsiae. 11: 81-274, 1873.

MUNOZ, V.; MORETII, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PROZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARD, B.; LE MEN-OLIVIER, L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera var heurkii* (Syn. *Tabernaemontana var heurkii*). **Planta Med**. 60: 455–459, 1994.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet** 366: 1561-1577, 2005.

NASCIMENTO, A. M.; SIQUEIRA C. J. Trypanocidal properties of *Mikania stipulacea* and *Mikania hoehnei* isolated terpenoids. **Fitoterapia** 75 (3-4): 381-4, 2004.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges.** 6: 754-65. 2008.

NWAKA, S.; RIDLEY, R.G. Drugs for Neglected Diseases initiative. **Nature Rev. Drug Discov.** 2, 919, 2003, (<http://www.dndi.org.br/>), acesso em 6 de Julho de 2010.

OGBADOYI, E.O.; ABDULGANIY, A.O.; ADAMA, T.Z.; OKOGUN, J.I. *In vitro* trypanocidal activity of *Annona senegalensis* Pears. Leaf extract against *Trypanosoma brucei brucei*. **J. Ethnopharmacol.** 112: 85-89, 2007.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. **Ribeirão Preto – SP: Editora Holos**, 64p, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Temas de Salud- Leishmaniasis. 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> > Acesso em: 24 mar. 2012

OSÓRIO, E.; ARANGO, G.J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M.A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **J. Ethnopharmacol.** 111: 630-635, 2007.

PAX, F.; HOFFMANN, K. Euphorbiaceae-Phyllanthoideae-Phyllanthaceae. *In*: A. Engler, **Das Pflanzenreich** IV. 147: 182-185, 1922.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. **ESALQ/USP**, p. 01 – 26, 2004.

PETHERICK, A. Country by country. **Nature** 465: S10-S11, 2010.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P. EPIFÂNIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. **Quim. Nova** 25: 45-61, 2002.

PUSZTAI, R.; FERREIRA, M.J.; DUARTE, N.; ENGI, H.; MOLNAR, J. Macrocyclic lathyrane diterpenes as antitumor promoters. **Anticancer Res.** 27: 201-205, 2007.

QUARESMA, P. F.; RÉGO, F. D.; BOTELHO, H. A. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579–585, 2011.

RASSI, A.; AMATONETO, V.; SIQUEIRA, A.F.; FERRIOLI, FILHO. F.; AMATO, V.S.; RASSI, G.G.; RASSI, J.A. Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox associado a corticóide. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35: 547-550, 2002.

RASSI, A., J. RASSI, A., MARIN-NETO, J. Á. Chagas disease. **Lancet.** 375:1388-1402, 2010.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveill** 15(10): 1-11, 2010.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349p. 2001.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet**. 7: 581-596, 2007.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 327p, 1997.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. Review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 12: 514-35, 2005.

ROGERO, S.O., LUGÃO, A.B., IKETA, T.I., CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials research**. v.6, n.3, 317-320, 2003.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO.; R. R., BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M.; SOUTO-PADRÓN T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 47:1895–1901, 2003.

SANTA-RITA, R. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Effect of the *lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine* and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J. Antimicrob. Chemother**. 54: 704–710, 2004.

SANTIN, M.R.; DOS SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; DIAS, FILHO.; B.P. FERREIRA, I.C., UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citrates* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res**. 105: 1489–1496, 2009.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T. M. A.; ROMANHA, A. J.; FILHO, J. D. S.; CORDELL, G. A.; ZANI, C.L. Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. **Phytochemistry** 64: 1125-1131, 2003.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas, pp. 1-12. In: Z. Brener, Z. A. Andrade & M. Barral-Netto, *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2 ed, cap.1, p. 1-15, 2000.

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**. 103:1–10, 2008.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Exp. Parasitol**. 116: 283-290, 2007.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. **Informe Epidemiológico**, Leishmaniose Visceral, 2009.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica** 115: 14-21, 2010.

SHARIEF, A. H.; KHALIL, E. A. G.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A.; OMER, S. A.; IBRAHIM, M. E. *Leishmania donovani*: an *in vitro* study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. **Exp. Parasitol.** 114: 247-252, 2006.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clín. Biol.** 20: 191-208, 1953.

SILVA, J.S.; SALES, F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. O gênero *croton* (euphorbiaceae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia** 4: 879-901. 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5 ed Florianópolis: **Ed. UFRGS**: 821p, 2004.

SHLAMOVITZ, G.; GUPTA, M.; DIAZ, J.A. Case of Acute Keratoconjunctivitis from Exposure to Latex of *Euphorbia Tirucalli* (Pencil Cactus). **J. Emerg. Med.** 36: 239-241, 2009.

SHUKLA, A.K.; SINGH, B.K.; PATRA, S.; DUBEY, V.K. (Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 160: 2208-2218, 2010.

SMIDERLE, F. R.; RUTHES, A. C.; ARKEL, J. V.; CHANPUT, W.; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; GRIENSVEN, L. J. L. D. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 58, p. 1-10, 2011.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENSTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.139-149, 2004.

SOUZA, A.M.T.; CASTRO, H.C.; BRITO, M.A.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; MAGALHÃES, U.; OLIVEIRA, K.N.; GASPARG-SILVA, D.; PACHECO, L. K.; JOUSSEF, A.C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M. O.; SANTOS, D. O.; ALBUQUERQUE, M.G.; RODRIGUES, C.R.; NUNES, R.J. *Leishmania amazonensis* Growth Inhibitors: Biological and Theoretical Features of Sulfonamide 4-Methoxichalcone Derivatives. **Curr. Microbiol.** 59: 374-379, 2009.

SOUZA, J.J.; VIEIRA, I.J.C.; MATHIAS L.; BRAZ-FILHO R. Alcaloides Indólicos de *Tabernaemontana hystrix*. **Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**, 2008.

SOUZA, E.M. Modulação induzida por estradiol na fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos. **Tese de mestrado**, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1999.

TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E.; VIEIRA, H. S. Isolamento e atividade tripanossomicida de diterpenos caurânicos de *Xylopiia frutescens* Aubl. **17ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Caxambu, 1994.

TARIKU, Y.; HYMETE, A.; HAILU, A.; ROHLOFF, J. Essential oil composition, antileishmanial and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chem. Biodivers.** 7: 1009–1018, 2010.

TARIKU, Y.; HYMETE, A.; HAILU, A.; ROHLOFF, J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. **Chem. Biodivers.** 8: 614–623, 2011.

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int. J. Cancer** 26:171–176, 1980.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE Jr, H.F.; GUALDA; N. C. A; YOGI; A; CRAVALHO; C.S; BACHIEGA; D; LUPO; F.N; BONOTTO; S.V; FISCHER; D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. **Phytomedicine** 12: 382-390, 2005.

TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hygiene** 52: 287-292, 1995.

TORRES-SANTOS, E. C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R. R.; CARAUTA, J. P. P.; FALCÃO, C. A. B.; KAPLAN, M. A.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine** 11: 114-20, 2004.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; KOREHISA, MAZA, P.; PRADO, DIAS, FILHO, B.; APARÍCIO, GARCIA.; CORTEZ, D.; ALVIANO, D.S.; ROSA, MDO, S.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA C. V. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol. Int.** 55: 99–105, 2006.

UCHIYAMA, N.; ITO, M.; KIUCHI, F.; HONDA, G.; TAKEDA, Y.; KHODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O. A. A trypanocidal diterpene with novel skeleton from *Dracocephalum komarovi*. **Tetrahedron Lett.** 45: 531-533, 2004.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.** 19: 495-501, 2003.

VENDRAMETTO, M. C; SANTOS, A. O; NAKAMURA, C. V; FILHO, B. P. D; CORTEZ, D. A. G; UEDANAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. **Parasitol. Inter.** 59: 154–158, 2010.

VERONESI, R. Tratado de infectologia. 3º Ed. São Paulo: **Editora Atheneu**. 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova** 26: 390-400, 2003.

VIEIRA, N. C.; ESPÍNDOLA, L.S.; SANTANA, J.M.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.L.; PINHEIRO, S.M.; ARAÚJO, R.M.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorg. Med. Chem.** 16: 1676-1682, 2008.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 16, suplemento 2, 2000.

WANG, C. C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. **Parasitol.** 114: S31-S44, 1997.

WEBSTER, G. L. Realignments in American Croton (Euphorbiaceae). **Novon** 2: 269-273, 1992.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the section of the genus Croton (Euphorbiaceae). **Taxon** 42: 793-823, 1993.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric tax of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 33-144, 1994.

WEBSTER, G. L. Synopsis of Croton and Phyllanthus (Euphorbiaceae) in western tropical Mexico. **Contributions From the University of Michigan Herbarium** 23: 353-388, 2001

WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacol.** 78: 193-200, 2001.

WILLCOX, M. L.; COSENTINO, M. J.; PINK, K. Natural products of the treatment of tropical diseases. **Trends in Parasitol.** 17: 58-60, 2001.

WRIGLEY, S.; HAYS, M.; THOMAS, R.; CHRYSTAL, E. A source of new industrial products. **Phytochemical diversity**, Cambridge: Thomas Graham House, 1997.

YANG, D. M. & LIEW, F. Y., Effects of *qinghaosu* (artemisin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitol.** 106: 7-11, 1992.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FECHINEL, FILHO. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria e fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova** 24: 147-52, 2001.