



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
MESTRADO EM FARMACOLOGIA**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 15 – Bairro Ininga

Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 3215-5872

E-mail: nppmpg@ufpi.br ou nppm@ufpi.br

**EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. E
DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. SOBRE A
INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis***

BERNARDO MELO NETO

**TERESINA - PIAUÍ
2011**

BERNARDO MELO NETO

EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. E DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde / Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

**TERESINA - PIAUÍ
2011**

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

Melo Neto, Bernardo.
M528e Efeito do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphilum* March. sobre a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis* / Bernardo Melo Neto. -- Teresina, 2011.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.
Bibliografia

1. *Protium heptaphilum* March. 2. *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. 3. *Leishmania amazonensis*. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.1

EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. E DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde / Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM FARMACOLOGIA.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

Data da aprovação: 16 de junho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho
Orientador
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
Membro Externo
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a. Dr^a. Veruska Cavalcanti Barros
Membro Interno
Universidade Federal do Piauí

Aos meus pais Bernardo Melo Filho e Rita de Cássia de Castro Melo, pessoas essenciais em minha vida, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus Irmãos Flávio, Marcelo e Liana por todo o apoio e amizade.

À Suziane, pelo companheirismo, dedicação, incentivo e amor.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho pelo exemplo de profissional, credibilidade e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me acompanha e mostra os melhores caminhos;

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho pelos ensinamentos, paciência e apoio durante esta caminhada;

À Doutoranda Sabrina Maria Portela Carneiro e à Ms. Lorena Citó Lopes Rezende Santana pelo acolhimento e contribuição na realização deste trabalho;

Aos professores da pós-graduação: André Soares, Amilton Costa, Aldeídia Oliveira, Fernanda Regina Almeida, Francisco Oliveira, Rozeverter Moreno Fernandes, Rita de Cássia Oliveira e Salete Brito, pela formação;

À Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes pelo acompanhamento durante a iniciação científica e vida acadêmica;

À Profa. Dra Veruska Cavalcanti Barros pelos auxílios e ensinamentos prestados;

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho pela cessão da cepa utilizada;

À Profa. Dra Roseli Farias Melo de Barros pelo exemplo de amor à profissão;

Ao Sr. Carlos Alberto de Deus, pela amizade e exímio cuidado dispensado ao biotério, de extrema importância para o êxito de nossos trabalhos;

À Gleyce Lima por seu trabalho desempenhado com dedicação junto à secretaria da Pós-graduação;

Aos meus alunos, pelo aprendizado diário proporcionado;

Ao Ms. Sérgio da Silva Pereira pelo fornecimento dos extratos e valioso auxílio na tabulação dos resultados;

Ao agora Biólogo Sérgio Ewerton Menezes dos Santos, pela amizade e auxílio na obtenção dos resultados;

À todos os amigos do Laboratório de Atividade Antileishmania: Adriana, Alessian, Layane, Klinger e Raimundo pelo companherismo e ajuda nas rotinas laboratoriais e a Joseana & Cia, pelos empréstimos de microscópio;

A todos os inesquecíveis amigos de turma do NPPM: Bethânia, Celyane, David, Elisangela, Irisdalva, Janaína, José Couras, Luciane, Luciano e Marcela pelos bons momentos vividos;

Aos que fazem parte da Família NPPM: Benedito, Edson, Daniel, Luciano, Rosemary, pela amizade e constante presença;

À FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí) pelo apoio financeiro;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo suporte técnico através do Portal Periódicos;

À Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico.

“Somente a força do conhecimento pode permitir ao homem realizar até as mais altas aspirações, porque é ela o maior estímulo a que pode ele aspirar. Quanto mais conhecimentos possua, mais força terá, e mais formosos serão os frutos de sua realização.”

Carlos Bernardo González Pecotche

Melo Neto, B. Efeito do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*. Pós-Graduação em Farmacologia. Dissertação de Mestrado, NPPM/CCS/UFPI (2011)

RESUMO

Palavras Chave: *Protium heptaphyllum* March. *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Atividade fagocitária. Macrófagos. *Leishmania amazonensis*.

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, afetando cerca de dois milhões de pessoas a cada ano e portanto classificadas como um problema de saúde pública. A descoberta de novas substâncias com promissor potencial leishmanicida e reduzida ação tóxica contra células de mamíferos tem fundamental importância para o controle e prevenção da leishmaniose. Sabendo que derivados vegetais estão entre as novas possibilidades para a obtenção de compostos bioativos, objetivou-se avaliar as atividades anti-leishmania, citotóxica e o efeito do extrato bruto etanólico (EEtOH) e frações acetato de etila (F. AcoEt), aquosa (F. AQ) e hexânica (F. HEX) obtidas da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* March (R. ALM) sobre a infectividade *in vitro* de macrófagos murinos por *Leishmania amazonensis*. Para tanto, formas promastigotas metacíclicas foram incubadas na presença dos extratos nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL em triplicatas, após 24, 48 e 72h os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e a concentração inibitória média (IC₅₀) calculada. A concentração citotóxica média (CC₅₀) foi mensurada pelo tratamento de macrófagos com os extratos nas concentrações descritas, posterior incubação com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazólio) e leitura por absorvância em 550 nm do formazan produzido pela redução do MTT. A investigação de parâmetros de resposta à ativação de macrófagos como a variação do volume lisossomal e a capacidade fagocítica frente os tratamentos foi realizada utilizando-se o corante vermelho neutro e partículas de zimosan coradas. Avaliou-se ainda o estímulo à produção de óxido nítrico pela dosagem de nitrito e a influência do pré-tratamento de macrófagos ou de formas promastigotas sobre a infecção por leishmanias. Verificou-se que o extrato, frações e resina ocasionaram notável inibição dose e tempo dependente no desenvolvimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, com valores de CI₅₀ em 72h de 9,57; 10,21; 11,06; 7,96 e 6,18 µg/mL para EEtOH, F. AcoEt, F. AQ, F. HEX e R. ALM respectivamente. Os valores de CC₅₀ obtidos para macrófagos foram maiores que 100 µg/mL para EEtOH, F. AcoEt, F. AQ e F. HEX, e de 53,99 µg/mL para R. ALM superando, portanto os valores de CI₅₀ para promastigotas. O extrato, frações e resina estimularam a atividade fagocítica e a produção de nitrito, sem portanto incrementar o volume lisossomal. O pré tratamento de macrófagos ou formas promastigotas revelou expressiva queda, tanto no percentual de infecção, quanto no número de amastigotas por macrófago de forma concentração dependente. Conclui-se portanto que o extrato, frações e resina apresentam significativa ação anti-leishmania e propriedades na redução da infectividade de macrófagos *in vitro*.

Melo Neto, B. Effect of extract and fractions of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. on infection of macrophages by *Leishmania amazonensis*. Post-Graduation Program in Pharmacology. Mastership Dissertation, NPPM/CCS/UFPI (2011)

ABSTRACT

Key-words: *Protium heptaphyllum* March, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Phagocytic activity. Macrophages. *Leishmania amazonensis*

The leishmaniasis are a group of diseases caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*, which affects about two million people each year and therefore classified as a public health problem. The discovery of new substances with promising leishmanicidal potential and reduced toxic action against mammalian cells has fundamental importance for the control and prevention of leishmaniasis. Knowing that derived from plants are among the possibilities for obtaining of bioactive compounds, aimed to evaluate anti-leishmania activity, cytotoxic and the effect of crude ethanol extract (EEtOH), ethyl acetate (F. AcoEt), aqueous (F. AQ) and hexanic (F. HEX) fractions from stem bark of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam and resin of *Protium heptaphyllum* March (R. ALM) on the infectivity of murine macrophages in vitro by *Leishmania amazonensis*. For this metacyclic promastigotes forms were incubated in the presence of extract and its fractions in the concentrations of 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 $\mu\text{g/mL}$ in triplicates, after 24, 48 and 72 h parasites were counted in the Chamber of Neubauer and mean inhibitory concentration (IC_{50}) calculated. The mean cytotoxic concentration (CC_{50}) was measured by treatment of macrophages with extract in concentrations already described, later incubation with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and by reading absorbance at 550 nm of the formazan produced by reduction of MTT. The investigation of parameters of response to activation of macrophages as the volume change of lysosomal and phagocytic ability front of the treatments was performed using neutral red dye and zymosan particles stained. We also evaluated the stimulation of nitric oxide production by measuring nitrite and the influence of pretreatment of macrophages or promastigotes of *Leishmania* infection. It was found that the extract, fractions and resin caused remarkable inhibition dose and time dependent on the development of promastigotes of *Leishmania amazonensis*, with IC_{50} values in 72 h, 9.57, 10.21, 11.06, 7.96 and 6.18 $\mu\text{g/mL}$ for EEtOH, F. AcoEt, F. AQ, F. HEX e R. ALM respectively. The values obtained for CC_{50} macrophages were all greater than 100 $\mu\text{g/mL}$, to EEtOH, F. AcoEt, F. AQ e F. HEX and 53.99 $\mu\text{g/mL}$ to R. ALM overcoming so the IC_{50} values for promastigotes. The extract, fractions and resin stimulated phagocytic activity and nitrite production, without increasing the volume lysosomal. The pretreatment of macrophages or promastigotes revealed a significant decrease in the percentage of infection and number of amastigotes per macrophage in a dose dependent. It is concluded that the extract, fractions and resin have significant anti-leishmania action and properties in reducing the infectivity of macrophages in vitro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TEPB	Herbário Graziela Barroso
UFPI	Universidade Federal do Piauí
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes”
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação com Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
SFB	Soro fetal bovino
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> – tampão fosfato-salino
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MTT	3-(4,5-dimethiazol-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
PA	Padrão analítico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CC ₅₀	Concentração citotóxica média
NO	<i>Nitric oxide</i> - óxido nítrico
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LPS	<i>lipopoly-saccharide</i> - lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
EEtOH	Extrato etanólico
F. AcoEt	Fração acetato de etila
F. AQ	Fração aquosa
F. HEX	Fração hexânica
R. ALM	Resina de <i>Protium heptaphyllum</i> March

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. 18
- Figura 02** – Algumas formas clínicas das leishmanioses. A: leishmaniose cutânea; B: leishmaniose mucosa; C: leishmaniose cutânea difusa; D: leishmaniose visceral. 20
- Figura 03** – *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. A: aspecto do galho florido ; B: aspecto do tronco. 25
- Figura 04** – *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. A: aspecto do tronco com resina exsudada. B: folhas e frutos. 27
- Figura 05** – Fluxograma da obtenção e rendimento das frações hexânica, acetato de etila e aquosa a partir do extrato etanólico obtido da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. 31
- Figura 06** – Preparação de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* para contagem. A: centrifugação a 367 G, 4°C ± 1 °C por 10 minutos; B: preparação da câmara de Neubauer e C: contagem das formas promastigotas por microscopia ótica. 32
- Figura 07** – Coleta de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de camundongos Swiss. A: retirada da pele ventral do animal; B: administração de salina no peritônio e C: aspiração do lavado intraperitoneal contendo células. 33
- Figura 08** – Reação de redução do MTT para formazan. 34

- Figura 09** – Microscopia ótica de macrófagos com partículas de zimosan fagocitadas. 36
- Figura 10** – Cultivo de macrófagos *in vitro*. A: plaqueamento de macrófagos; B: lamínula contendo monocamada de macrófagos e C: visualização dos macrófagos infectados em microscopia ótica. 37
- Figura 11** – Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. 40
- Figura 12** – Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. 40
- Figura 13** – Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. 41
- Figura 14** – Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. 41
- Figura 15** – Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. 42
- Figura 16** – Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorbâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 44

- Figura 17** – Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 44
- Figura 18** – Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 45
- Figura 19** – Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 45
- Figura 20** – Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 46
- Figura 21** – Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 47
- Figura 22** – Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m. 47
- Figura 23** – Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos 48

tratados com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m.

Figura 24 – Fagocitose de partículas zimosan pelos macrófagos tratados 48
com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos
como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m.

Figura 25 – Fagocitose de partículas zimosan pelos macrófagos tratados 49
com resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Valores expressos
como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m.

Figura 26 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos 50
tratados (A) e por macrófagos estimulados por promastigotas (B).

Figura 27 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos 51
tratados com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e
macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B).

Figura 28 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos 52
tratados com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A)
e macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B).

Figura 29 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos 53
tratados com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e
macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B).

Figura 30 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos 54
tratados com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e
macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B).

Figura 31 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos 55
tratados com *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (A) e macrófagos pré-
tratados estimulados por promastigotas (B).

- Figura 32** – Microscopia ótica de cultivo de macrófagos (2×10^5 células/poço) infectados com *Leishmania amazonensis* (2×10^6 promastigotas/poço). A e B: macrófagos do grupo controle apresentando um maior número de formas amastigotas, C e D: macrófagos do grupo pré-tratados com F.AQ. 88,6 µg/mL. 56
- Figura 33** – Efeito do pré-tratamento de macrófagos com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. 57
- Figura 34** – Efeito do pré-tratamento de macrófagos com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. 57
- Figura 35** – Efeito do pré-tratamento de macrófagos com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. 58
- Figura 36** – Efeito do pré-tratamento de macrófagos com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. 58
- Figura 37** – Efeito do pré-tratamento de macrófagos com resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. 59
- Figura 38** – Efeito do pré-tratamento de leishmanias com extrato etanólico 44 µg/mL (EEtOH), frações acetato de etila 7,5 µg/mL (F.AcoET), aquosa 151 µg/mL (F. AQ) e hexânica 4 µg/mL (F. HEX) de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam e resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. 35,21 µg/mL (R. ALM) sobre a infecção de macrófagos. 60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** – Concentrações do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. capazes de reduzir 50% da viabilidade dos macrófagos(CC₅₀) em 48 horas. 39
- Tabela 02** – Concentrações inibitórias médias (CI₅₀) do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre o crescimento de *Leishmania amazonensis* após 24, 48 e 72 horas de incubação. 42
- Tabela 03** – Relação entre a toxicidade do extrato, frações e resina para os macrófagos murinos (CC₅₀) e a toxicidade para o parasito (CI₅₀) - índice de seletividade. 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Leishmanioses	18
1.2 Características da resposta imune	21
1.3 Drogas de referência no tratamento e controle das leishmanioses	22
1.4 O uso de plantas medicinais no tratamento das leishmanioses	23
1.5 <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae)	24
1.6 <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. (Burseraceae)	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.1 Objetivos específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material Botânico	30
3.2 Obtenção dos extratos e frações de partição	30
3.3 Animais	31
3.4 Cultivo dos parasitas	32
3.5 Elicitação e cultivo de macrófago peritoneais de camundongo	33
3.6 Avaliação da citotoxicidade do extrato e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. e da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. sobre macrófagos murinos	34
3.7 Avaliação do efeito do extrato e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. e da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	35
3.8 Determinação de parâmetros de ativação de macrófagos	35
3.8.1 Preparo de soluções	35
3.8.2 Ensaio de determinação do volume lisossomal	35
3.8.3 Ensaio de determinação da capacidade fagocítica	36
3.9 Quantificação de óxido nítrico liberado por dosagem colorimétrica de nitrito	36

3.10 Infecção de macrófagos pré-tratados <i>in vitro</i> por <i>Leishmania amazonensis</i>	37
3.11 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i> por <i>Leishmania amazonensis</i> pré-tratadas	38
3.12 Análise dos resultados	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação da citotoxicidade do extrato e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. e da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. sobre macrófagos murinos	39
4.2 Avaliação do efeito do extrato e frações de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. e da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	39
4.3 Determinação de parâmetros de ativação de macrófagos	43
4.3.1 Ensaio de determinação do volume lisossomal	43
4.3.2 Ensaio de determinação da capacidade fagocítica	46
4.4 Quantificação de óxido nítrico liberado por dosagem colorimétrica de nitrito	49
4.5 Infecção de macrófagos pré-tratados <i>in vitro</i> por <i>Leishmania amazonensis</i>	56
4.6 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i> por <i>Leishmania amazonensis</i> pré-tratadas	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	65
7 PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um diverso grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, afetando cerca de dois milhões de pessoas por ano, com cerca de 350 milhões de indivíduos em risco em todo o mundo e portanto, consideradas um grave problema de saúde pública, endêmicas em 88 países. Estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas, estando o Brasil entre os sete países com mais casos da doença (DESJEUX; ALVAR, 2003; MONZOTE et al., 2007; WHO, 2010).

Os parasitos causadores destas protozooses apresentam ciclo biológico digenético (Figura 01): nos hospedeiros vertebrados, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, e no vetor flebotomíneo, forma promastigota extracelular que parasita o trato digestivo do inseto.

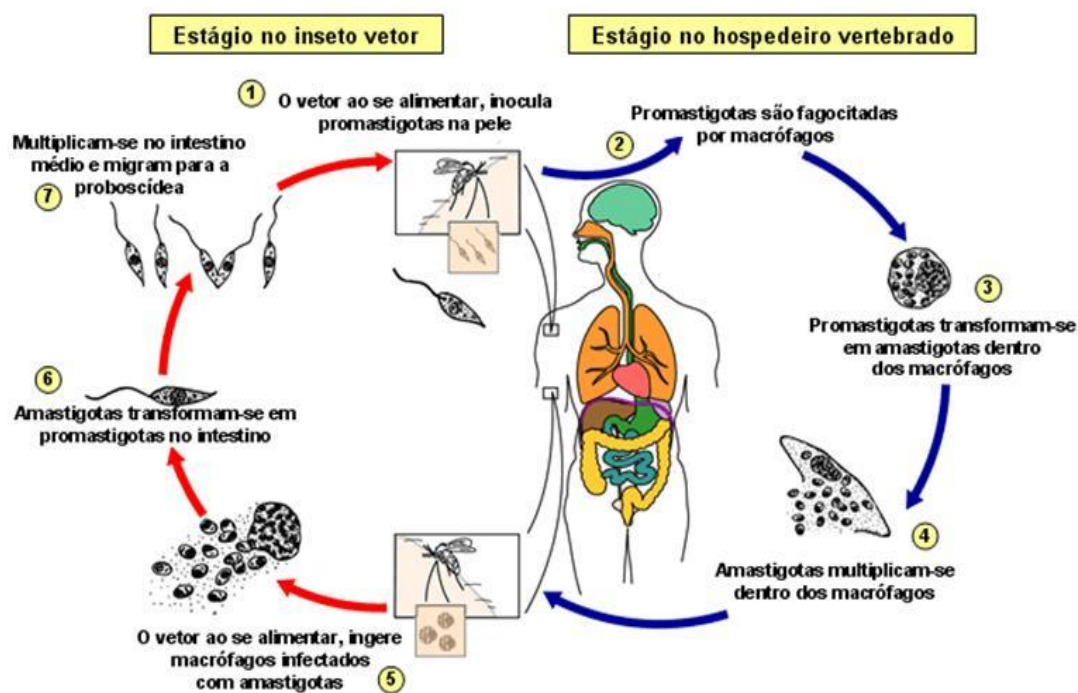


Figura 01: Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Os parasitas são transmitidos durante o repaste sanguíneo do vetor, que juntamente com a saliva, regurgita formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro vertebrado. Estas formas promastigotas são fagocitadas por células residentes no local da inoculação tais como macrófagos, monócitos e células de *Langerhans*. No interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas, permanecendo dentro de fagolisossomos, onde, então, originam o vacúolo parasitóforo, no qual iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. Cada célula infectada é capaz de abrigar grande número de formas amastigotas, quando então as células se rompem e liberam os parasitas, que podem ser fagocitados por novas células.

Durante a hematofagia, fêmeas de flebotomíneo, ainda não infectadas, podem ingerir formas amastigotas presentes no local da picada. As mesmas, ao chegarem ao intestino do vetor diferenciam-se em formas promastigotas, que podem ser encontradas livres ou aderidas no epitélio do trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. As promastigotas denominadas procíclicas multiplicam-se, amadurecem e aderem-se ao epitélio do esôfago e faringe do vetor, local onde se processa uma nova diferenciação para a forma promastigota metacíclica, as quais dirigem-se então para a parte anterior do aparelho bucal do vetor. O ciclo biológico do parasita completa-se quando o vetor flebotomíneo, agora infectado, alimenta-se de outro hospedeiro vertebrado ainda não infectado (KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 1991, OLIVEIRA, 2010)

O Brasil tem experimentado um aumento acentuado no número de casos de leishmaniose desde 1999, existindo historicamente epidemias rurais em ciclos de 10 anos, sendo as crianças as mais afetadas. No entanto, a doença aparece agora em perímetros urbanos devido a grande escala de migração de pessoas das áreas rurais para as periferias das grandes cidades resultando em regiões densamente povoadas (WHO, 2010).

O quadro clínico tem manifestações características, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro, variando de uma infecção assintomática até formas clínicas principais (Figura 02): leishmaniose cutânea, cutânea difusa, cutâneomucosa e leishmaniose visceral, esta última com alta mortalidade (GHAZANFARI; HASSAN; KHAMESIPOUR, 2006, MARTÍN-QUINTAL et al., 2009).

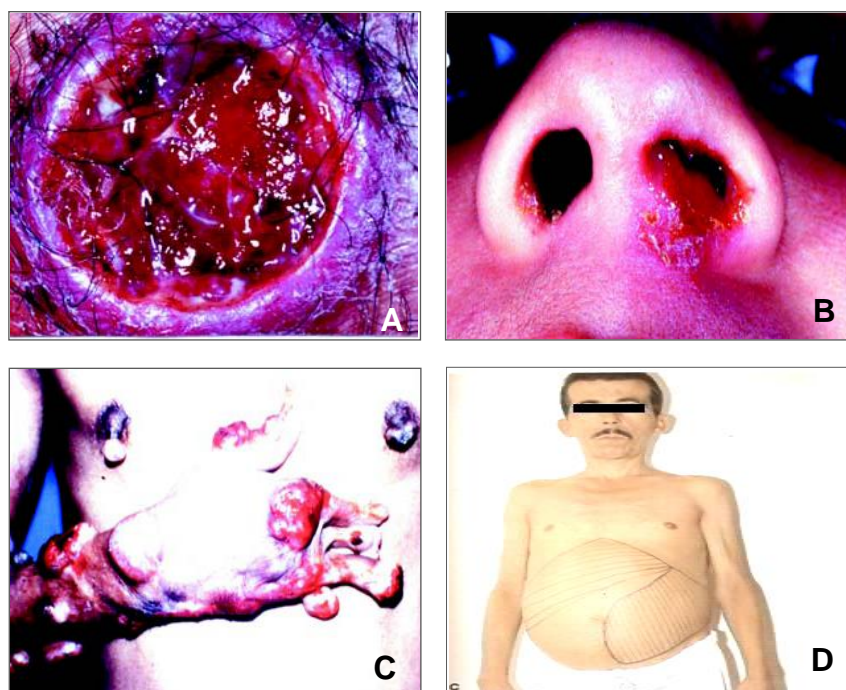


Figura 02: Algumas formas clínicas das leishmanioses. A: leishmaniose cutânea; B: leishmaniose mucosa; C: leishmaniose cutânea difusa; D: leishmaniose visceral. Fontes: Gontijo e Carvalho (2003); Rocha e Campos (2006).

A forma cutânea localizada apresenta como lesão típica, úlcera indolor, de bordo elevado e fundo granuloso, podendo ser única ou múltipla. A forma cutânea disseminada apresenta-se como úlceras múltiplas e pequenas, resultantes da disseminação hematogênica ou linfática, geralmente encontrada em pacientes imunodeprimidos. Essas formas são causadas principalmente pelas espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni* e *L. (Leishmania) amazonensis* (MURBACK et al., 2011). A forma cutaneomucosa caracteriza-se por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas e resulta da extensão direta ou de metástase hematogênica de lesão cutânea primária, sendo seu principal agente etiológico a *L. (Viannia) braziliensis* (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Já a apresentação cutânea difusa, causada no Brasil pela *L. (Leishmania) amazonensis*, caracteriza-se por lesões nodulares não-ulceradas, precedidas por úlcera única que evolui com disseminação linfática do parasito (BRASIL, 2000; MURBACK et al., 2011). Na forma visceral da doença o paciente geralmente apresenta febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia característica (BRASIL, 2006)

1.2 Características da resposta imune

A regressão das leishmanioses em humanos e em modelos experimentais correlacionam-se com o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1, sendo o interferon-gama (IFN- γ) a molécula central neste processo. Em contrapartida, uma resposta Th2, com produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), muitas vezes resulta na progressão da doença (HERNÁNDEZ-CHINEA, 2007; COELHO et al., 2010).

Linhagens susceptíveis de camundongos, como BALB/c, apresentam uma doença progressiva e severa, com um aumento na expressão de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para IL-4 e na produção de interleucina 5 (IL-5), IL-10 e interleucina 13 (IL-13) (SCOTT; FARREL, 1998; HIMMELRICH et al., 2000). IL-4 por sua vez, diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da interleucina 12 (IL-12) nas células Th1, suprimindo a produção de IFN- γ , o que leva ao desenvolvimento da resposta Th2. A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrofágica e contribui para o crescimento do parasito nas lesões, uma vez que camundongos BALB/c com supressão de IL-10 mostraram-se capazes de controlar a progressão da doença durante infecção (REIS et al., 2006).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade. Esta resposta envolve o papel das citocinas, das moléculas co-estimulatórias e da saliva do flebotomíneo (ROGERS et al., 2002). Na leishmaniose humana, o papel da resposta imune celular do tipo Th1 tem sido associado ao controle da infecção. O evento crucial para indução da resposta imune protetora contra a *Leishmania* é a eficiente ativação de células capazes de produzir citocinas que levem à ativação de macrófagos, via IFN- γ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (BOGDAN; RIILLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2006).

1.3 Drogas de referência no tratamento e controle das leishmanioses

As leishmanioses compõem juntamente com várias outras doenças infecciosas um grupo de enfermidades negligenciadas por diversos aspectos, mas, principalmente, pela falta de auxílio na investigação de novos medicamentos para o seu tratamento (DESJEUX, 1999; LIMA et al., 2007).

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e na eliminação de cães infectados, que são reservatórios de parasitos em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com os fármacos disponíveis no mercado mundial (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Até o momento, não existe terapêutica ideal para as leishmanioses. A quimioterapia de primeira linha é ainda baseada em antimoniais pentavalentes na grande maioria dos casos. Os fármacos recomendados na terapia secundária incluem anfotericina B e pentamidina. No entanto, estes agentes têm várias desvantagens: todas eles requerem administração parenteral, são tóxicos, têm alto custo, longa duração da terapêutica e com espectro terapêutico restrito a algumas formas clínicas da leishmaniose (MONZOTE et al., 2007; NICOLETTI; SEIFERT; GILBERT, 2009). A miltefosina é uma alternativa ao tratamento da leishmaniose mucosa, sendo ativa por via oral, o que reduziria as altas taxas de evasão ao tratamento. No entanto dados laboratoriais iniciais, sugerem que ela também pode não ser particularmente eficaz contra todas as formas (ESTEVEZ et al., 2007).

Lima e colaboradores (2007), que realizaram uma revisão das drogas utilizadas no tratamento das leishmaniose, abordando aspectos como doses empregadas, toxicidade, duração de tratamento e reincidivas, afirmam que o mecanismo de ação de algumas delas continua parcialmente desconhecido e sua efetividade varia de acordo com fatores como a cepa do parasito, o estado imunológico do paciente e a forma clinica, podendo não efetivar a cura ou ainda manifestar resistência do parasita.

Apesar da descoberta de novos medicamentos anti-protozoários, as infecções parasitárias humanas como a leishmaniose ainda são um grave desafio. Estima-se que dois terços da população mundial dependem tanto de medicamentos

tradicionais como de produtos naturais que possuem propriedades anti-parasitárias, com, às vezes, surpreendente eficácia e boa seletividade (MOO-PUC; ROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 2008).

1.4 O uso de plantas medicinais no tratamento das leishmanioses

Silva e colaboradores (2008) relatam que no contexto da sociedade moderna, é crescente o interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especificamente aqueles derivados de plantas, sendo a fitoterapia estimulada pela Organização Mundial de Saúde em seu programa de saúde.

Em muitas sociedades tradicionais as informações sobre plantas medicinais são passadas de geração a geração e fazem parte da sua cultura (AGRA et al., 2008), algumas possuem uma ampla farmacopéia natural e o interesse acadêmico por este conhecimento aumentou após a constatação de que este saber, desenvolvido ao longo dos séculos, pode ter uma comprovação científica, habilitando a extensão do seu uso pela sociedade industrializada (SOUZA; WIEST, 2007). Fernandes, Santos e Pimenta (2005) reforçam esta idéia, lembrando que algumas investigações sobre espécies de uso medicinal empírico já resultaram em alguns avanços terapêuticos ressaltando no isolamento dos primeiros compostos de produtos vegetais, incluindo alcalóides como morfina e estricnina no fim do século XIX e início do século XX.

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. Temos um país rico em diversidade biológica, cujo território possui cinco principais biomas a floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, camptotecina e taxol, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com

estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Tradicionalmente, as plantas vêm sendo bastante utilizadas na medicina popular para tratar doenças parasitárias e atualmente, elas têm recebido uma atenção especial na procura de novas terapêuticas contra leishmaniose (KAYSER et al., 2001). Neste sentido, várias plantas, produtos naturais e compostos isolados já foram estudados até o momento para o tratamento da leishmaniose e apresentaram-se ativos.

Dentre as espécies que demonstraram resultados promissores quando investigadas quanto à atividade anti-leishmania estão: *Croton cajucara*, especificamente o óleo essencial da casca do caule que apresentou atividade sobre formas promastigotas e amastigotas (ROSA et al., 2003); alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum* (FERREIRA et al., 2004); extrato hidroalcoólico de *Tanacetum parthenium* (TIUMAN et al., 2005); diterpenos de *Laetia procera* que apresentou atividade sobre formas amastigotas (JULLIAN et al., 2005); óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (MONZOTE, 2007); extrato de *Tridax procumbens* L. (MARTÍN-QUINTAL et al., 2009); triterpeno isolado de *Lophanthera lactescens* (DANELLI et al., 2009); óleo essencial de *Piper auritum* (MONZOTE et al., 2010); extrato de *Blepharocalyx salicifolius* (SIQUEIRA et al., 2010) e esteróides de *Physalis angulata* L. (GUIMARAES et al., 2010)

Diante do apresentado, salientando a necessidade em reduzir as dificuldades no tratamento das leishmanioses, e a importância da investigação de novas substâncias, o presente trabalho propõe avaliar os efeitos do extrato bruto e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre a atividade fagocitária de macrófagos contra *Leishmania amazonensis*.

1.5 *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)

Zanthoxylum rhoifolium Lam. (Figura 03) é uma planta da família Rutaceae que ocorre em todo o Brasil, principalmente na mata pluvial da encosta atlântica e na floresta semidecídua de altitude. Possui os mais diversos nomes populares, entre eles: mamica-de-cadela, mamica-de-porca, tembetari, mamiqueira, juva, juvevê, jubebê, teta-de-cadela, espinho-de-vintém, tembetaru, tambatarão, tinguaciba, guarita e tamanqueira. Caracteriza-se morfológicamente por ser uma planta

aculeada de 6 a 12 m de altura, com tronco de 30 a 40 cm de diâmetro, possuir copa densa e caracteristicamente arredondada, apresentar folhas compostas de 5 a 13 pares de folíolos às vezes aculeado na face inferior de 4 a 8 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura (LORENZI, 1992).



Figura 03: *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. A: aspecto do galho florido; B: aspecto do tronco
Fontes: Lorenzi (1992) e <http://www.rapaluruquay.org/organicos/tembetari.jpg>.

Ocorre preferencialmente em terrenos íngremes e pedregosos onde a drenagem é rápida. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, que garante sua regeneração natural. Floresce durante os meses de outubro e novembro. A maturação de seus frutos ocorre entre os meses de março e junho (LORENZI, 1992).

Na Guiana Francesa é utilizada tradicionalmente na medicina popular para tratar e prevenir o desenvolvimento de malária; na Bolívia, a casca e as folhas são cozidas e utilizadas como antipiréticas pelos índios; no Peru essa planta tem propriedades digestiva e tônica; e, em outros países como o Brasil, a espécie tem sido popularmente utilizada contra processos inflamatórios, microbianos, cancerosos e no tratamento da malária. (JULLIAN et al., 2006; Da SILVA; FIGUEREDO; YANO, 2007a). É rica em metabólitos secundários, principalmente lignanas e alcalóides da classe dos benzofenantridinicos. Estudos demonstraram que estes alcalóides

apresentam atividades farmacológicas importantes, tais como antimicrobiana e estimulante cardiorespiratória (ZANON et al., 2008).

Da Silva, Figueredo e Yano (2007b) avaliaram a atividade citotóxica do óleo essencial extraído das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. contra células tumorais *HeLa* (carcinoma cervical humano), A-549 (carcinoma de pulmão humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), e células não tumorais, Vero (rim de macaco) e macrófagos de camundongos. Também foram testados alguns terpenos constituintes do óleo volátil (β -cariofileno, α -humuleno, α -pineno, mirceno e linalool), verificando sua participação na citotoxicidade apresentada pelo óleo. Os resultados mostraram que o óleo volátil é citotóxico apenas contra células tumorais, mas não apresenta citotoxicidade contra as células não tumorais. Esse mesmo grupo mostrou ainda que o óleo essencial extraído das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e o β -cariofileno promovem aumento da sobrevivência de camundongos portadores do tumor ascítico de Erlich (4 dias com 20 mg/kg), o que não aconteceu com os terpenos α -humuleno, α -pineno e β -pineno. Enquanto que nos estudos *in vitro* o óleo essencial e o β -cariofileno apresentaram pouca atividade contra as células tumorais, o que os levou a crer que isso se deva a uma ação imunomoduladora, relacionada ao fato do β -cariofileno realizar sinergismo com outros compostos presentes no óleo volátil das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.

A análise do extrato etanólico e frações de partição de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, por meio de cromatografia em camada delgada de gel de sílica, usando reveladores específicos, sugeriu a presença de substância de natureza isoprênica (triterpenos e esteróides), sobretudo na fração hexânica, bem como de flavonóides e alcalóides na fração AcOET e fração aquosa. A presença de triterpenos na espécie foi confirmada pelo isolamento e identificação do lupeol. (CAMELO et al., 2005). Pereira e colaboradores (2010) confirmaram o efeito antinociceptivo do extrato etanólico e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* em modelos de nocicepção química e indicaram que o lupeol parece ser um dos componentes responsáveis por este efeito.

1.6 *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Burseraceae)

A espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Figura 04), conhecida popularmente como almécega, é encontrada na região Amazônica, no Piauí, na Bahia, em Minas Gerais e Goiás, e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai (CORRÊA, 1984). Esta espécie exsuda uma resina oleosa e amorfa, cujas aplicações gerais vão desde a fabricação de vernizes e tintas, na calafetagem de embarcações, em cosméticos e em repelentes de insetos. A resina da almécega é constituída por substâncias de natureza terpênica, sendo o óleo essencial rico em



Figura 04: *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. A: aspecto do tronco com resina exsudada. B: folhas e frutos. Fonte: http://www.ulf-mehlig.de/jpg/dunes/du_protium-1-0.html.

monoterpenóides e fenilpropanóides. Entre os constituintes, a literatura registra a presença de um monoterpene trioxigenado e quatro misturas binárias de triterpenóides (JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005), alfa e beta amirinas, taraxastano-3, 20-diol, taraxastano-3-oxo-20-ol e sitostenona (MAIA *et al.*, 2000).

Na medicina popular as resinas das espécies de *Protium* são usados para muitos propósitos, por exemplo, tônicas e estimulantes, tratamento de úlceras, e como agente cicatrizante. Outros gêneros são descritos como possuindo propriedades anti-sépticas sobre doenças de pele e anti-tumoral (LORENZI, 1992; SIANI *et al.*, 1999, CITÓ *et al.*, 2006). Sua utilização popular como analgésico (CORREIA, 1984) é amplamente difundida, tendo propriedades gastroprotetora e anti-inflamatória comprovadas (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Estudos preliminares relataram que o óleo essencial da resina e *Protium heptaphyllum* causou a inibição da pleurisia induzida por zymosan ou lipopolissacarídeo em camundongos e verificou-se possuir propriedades antinociceptiva em modelos de ratos. Já existem também relatos de significativa atividade anti-inflamatória do óleo em modelos agudos e crônicos, sendo este efeito decorrente possivelmente da presença de monoterpenos, tais como d-limoneno (AMARAL et al., 2009) e de atividades sedativa, hipnótica e antinociceptiva atribuídas aos terpenos alfa e beta amirina (OLIVEIRA et al., 2005; ARAGÃO et al., 2006)

Em virtude das evidências e propriedades atribuídas a *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e à resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., fundamenta-se então avaliar suas potencialidades anti-leishmania e parâmetros na resposta de ativação de macrófagos, sabendo-se que a descoberta de novas substâncias com promissor potencial leishmanicida tem relevante importância para o controle e prevenção das leishmanioses.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar a atividade leishmanicida e a capacidade de ativação de macrófagos de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre macrófagos murinos;
- Avaliar a atividade do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Determinar a capacidade de ativação de macrófagos através da variação do volume lisossomal e da capacidade fagocítica de macrófagos murinos frente à ação do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.;
- Avaliar a indução da síntese de óxido nítrico por macrófago murinos na presença do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.;
- Verificar a influência do pré-tratamento de macrófagos murinos com extrato, frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre a infecção por formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com o extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre a infecção de macrófagos murinos por formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

Os exemplares botânicos de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) foram coletados em fevereiro de 2008, no município de Pedro II, distante 220 Km da Capital do Piauí, situado na mesorregião do Centro-Norte Piauiense, localizado a uma latitude de 04°25'29" sul e a uma longitude 41°27'31" oeste. A determinação botânica do material foi procedida no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí (TEPB/UFPI) e um exemplar foi depositado sob exsicata nº TEPB 13.870.

A resina do tronco de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Burseraceae), foi coletada em almecegal existente no município de Timom-MA, cidade vizinha à Teresina, distante 426 km de São Luís, a uma latitude de 05°05'38" sul e longitude 42°50'13" oeste. A espécie vegetal foi coletada nesse local, identificada no TEPB/UFPI e registrada com exsicata nº TEPB 18.247.

3.2 Obtenção dos extratos e frações de partição

A obtenção do extrato etanólico bruto da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (EEtOH) e suas frações, bem como a purificação da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí sob orientação e supervisão das Professoras Dr^a. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Dr^a. Mariana Helena Chaves.

A casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. foi lavada, seca, triturada e a extração realizada por maceração à temperatura ambiente, por meio do solvente orgânico etanol. Após filtração em filtro de celulose e concentração do solvente em rotaevaporador sob pressão reduzida, o extrato etanólico foi ressuspenso em 350

mL de mistura metanol/água destilada (3:4) e extraído com hexano. Obteve-se então uma fração hexânica (F. HEX) e outra hidroalcoólica, sendo esta última extraída com acetato de etila, originando as frações acetato de etila (F. AcoEt) e aquosa (F. AQ) (Figura 05). As soluções extrativas foram concentradas através de evaporador rotativo sob pressão reduzida e liofilizadas. O extrato e as frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. utilizadas neste trabalho foram preparados e gentilmente cedidos por Ms. Sérgio da Silva Pereira.

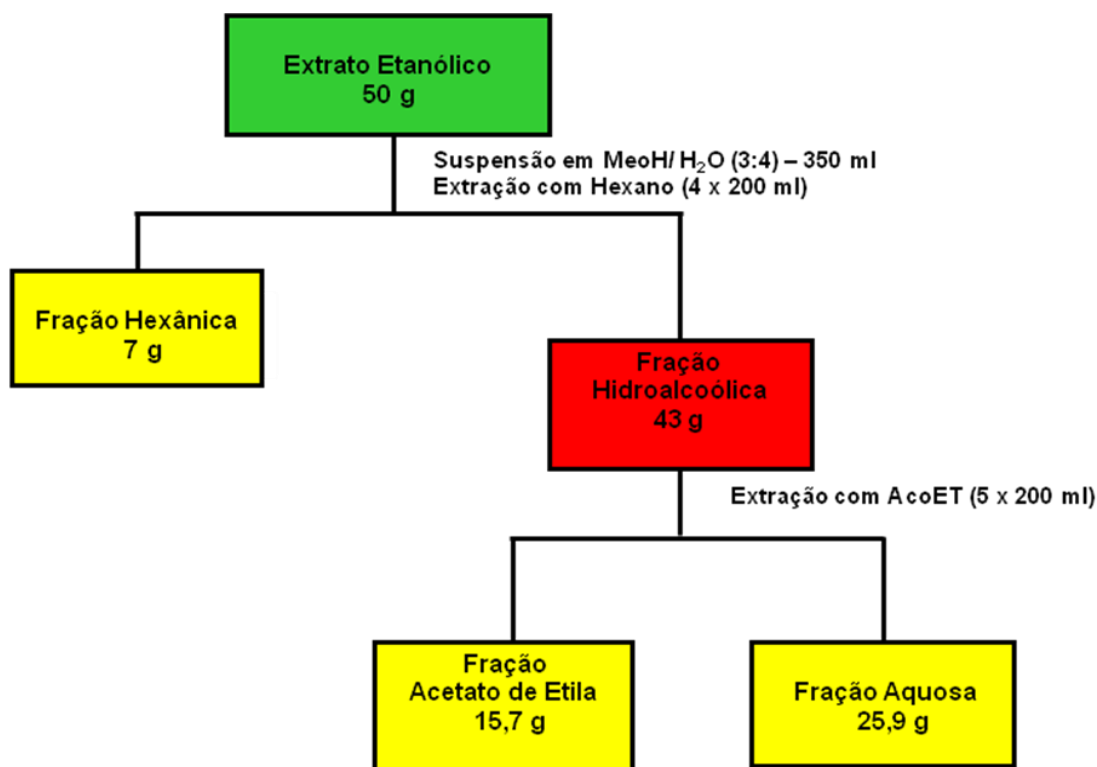


Figura 05: Fluxograma da obtenção e rendimento das frações hexânica, acetato de etila e aquosa a partir do extrato etanólico obtido da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.

Para a purificação da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., dissolveu-se 410 g do material vegetal em metanol/diclorometano na proporção 4:1, filtrou-se em filtro de celulose e retirou-se o solvente por evaporação rotativa sob pressão reduzida obtendo-se 408 g de resina (R. ALM).

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, de ambos os sexos e peso entre 20 e 25 gramas, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes” NPPM - UFPI, mantidos sob condições de controle de temperatura a 25 ± 1 °C e ciclo claro-escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI N° 0022/10). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estavam em conformidade ao Parágrafo Único do Artigo 2º da Resolução N° 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV.

3.4 Cultivo dos parasitas

Utilizou-se parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa IFLA/BR/1967/PH-8, gentilmente cedida pelo Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, mantida por sucessivas passagens em camundongos Balb/c e replicada em frascos de cultivo celular com meio Schneider's (Sigma, Chemical Co, ST Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino – SFB (Sigma) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg (Sigma) em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 26 ± 1 °C.

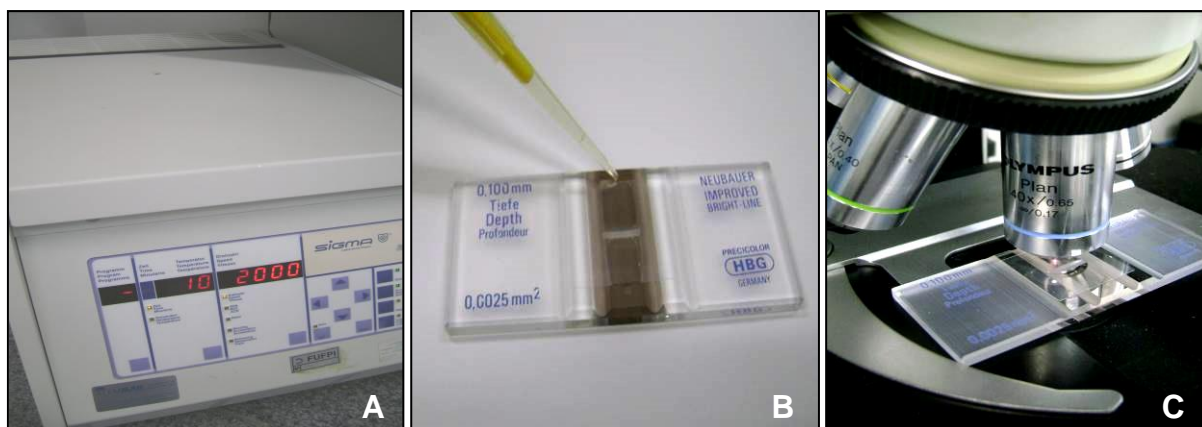


Figura 06: Preparação de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* para contagem. A: centrifugação a 367 G, $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ °C por 10 minutos; B: preparação da câmara

de Neubauer e C: contagem das formas promastigotas por microscopia ótica. MELO NETO, B., 2011. Fotografia digital.

No momento anterior ao uso, as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram lavadas com solução salina 0,9% estéril por meio de centrifugação a 367 G, $4 \pm 1^\circ\text{C}$, 10 minutos e contadas em Câmara de Neubauer, tendo o volume ajustado para a concentração desejada (Figura 06).

3.5 Elicitação e cultivo de macrófago peritoneais de camundongo

Foram utilizados macrófagos peritoneais residentes obtidos de camundongos Swiss. Para tanto, depois de anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina 2 mg/Kg de peso vivo e cloridrato de ketamina 15 mg/Kg de peso vivo os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, imersos em álcool 70% por um minuto para anti-sepsia e fixados em suporte na posição de decúbito dorsal.

Em fluxo laminar, o peritônio foi exposto por dissecação da pele ventral e administrou-se na cavidade abdominal, por agulha acoplada à seringa estéril, cerca de 8mL de tampão fosfato-salino (PBS - *Phosphate Buffer Saline*), pH 7,4, estéril, a 4°C . Após leve massagem no abdômen do animal, a solução contendo macrófagos do peritônio foi aspirada e reservada em tubo cônico estéril, sobre banho de gelo (Figura 07).



Figura 07: Coleta de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de camundongos Swiss. A: retirada da pele ventral do animal; B: administração de salina no peritônio e C: aspiração do lavado intraperitoneal contendo as células (SANTANA, 2009).

Esse material foi submetido à centrifugação a 184 G ,por 10 minutos, a 4°C por duas vezes, intercaladas pela lavagem das células com salina 0,9% estéril. Ao final o sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 2 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg e realizada a contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Trypan para a análise da viabilidade celular.

3.6 Avaliação da citotoxicidade do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre macrófagos murinos

Seguiu-se o protocolo adaptado de NOGUEIRA et al. (2007) e ESTEVEZ et al. (2007). Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado, contendo cerca de 1×10^5 macrófagos por poço e incubou-se por 4 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ para adesão das células à placa. Decorrido este tempo, foi realizada lavagem com meio RPMI 1640 completo para retirada das células não aderidas e o extrato, frações e resina adicionados em triplicata, previamente diluídos em RPMI 1640 ao volume final de 100 µL para cada poço nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de 3-(4,5-dimethiazol-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) diluídos em PBS a uma concentração de 5mg/mL. Após incubação por 4 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) inclusive nos poços controle. O formazam (Figura 08) precipitado foi ressuspendido por rotação em agitador de Kline por 30 minutos em temperatura ambiente e a leitura das absorbâncias realizada a 550nm em leitora Biotek modelo ELx800.

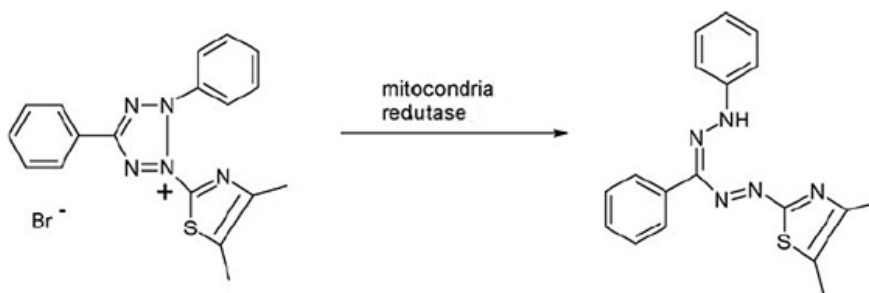


Figura 08: Reação de redução do MTT para formazan.

Fonte: <http://www.biocompare.com/images/bc/006/ArticleImages.jpg>

3.7 Avaliação do efeito do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

As formas promastigotas em sua fase logarítmica de crescimento foram distribuídas em placas de 96 poços para cultivo celular contendo meio de Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 leishmanias por poço. Em seguida, o extrato, suas frações e a resina foram adicionados aos poços, em diluições seriadas na escala de 1:2, iniciando com uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ e seguindo até 3,13 $\mu\text{g/mL}$. Incubou-se as placas em estufa BOD à temperatura de 26°C e os parasitos foram observados e contados em câmara de Neubauer, após 24, 48 e 72 horas para o acompanhamento de seu crescimento e viabilidade.

3.8 Determinação de parâmetros de ativação de macrófagos

3.8.1 Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro foi preparada pela solubilização de 0,02 g de corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de extração utilizada nos dois protocolos consistiu de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque e 0,02 g de zimosan não opsonizado em 3 mL de PBS, já o fixador de utilizado foi o Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% p/v e acetato de cálcio 1% p/v em água destilada (BONATTO, 2008).

3.8.2 Ensaio de determinação do volume lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com o extrato, suas frações e com a resina conforme descrito no item 3.6. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% em DMSO e voltou-se a incubar durante 30 minutos. Transcorrido este tempo, o sobrenadante foi descartado, procedeu-se a lavagem dos poços com salina 0,9% a 37°C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após trinta minutos em agitador de Kline a placa foi lida a 550 nm em leitora Biotek modelo ELx800 (BONATTO, 2008).

3.8.3 Ensaio de determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com o extrato, suas frações e com a resina conforme descrito no item 3.6. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL da solução de zimosan corado e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker, para paralisar o processo de fagocitose (Figura 09) e, 30 minutos posteriormente, a placa foi lavada com salina 0,9% a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 100 µL de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline as absorvâncias foram medidas a 550 nm em leitora Biotek modelo ELx800. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o grupo controle considerado como 100% (BONATTO, 2008).

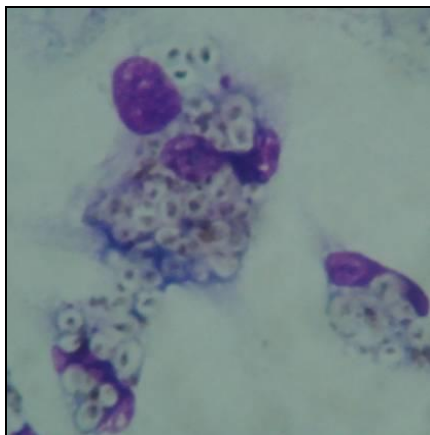


Figura 09: Microscopia ótica de macrófagos com partículas de zimosan fagocitadas. Aumento de 100X. MELO NETO, B., 2011. Fotografia digital.

3.9 Quantificação de óxido nítrico liberado por dosagem colorimétrica de nitrito

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 macrófagos por poço e incubados com o extrato, suas frações e com a resina conforme descrito no item 3.6. Transcorridas 24 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, transferiu-se os sobrenadantes do cultivo celular para uma outra placa de 96 poços para a dosagem do nitrito. Repetiu-se o mesmo protocolo pré-tratando os macrófagos por 30 minutos e incubando-os por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, na presença de 2×10^6 leishmanias por poço.

A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® à concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM diluídos em meio de cultura. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H₃PO₄ 10% (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e procedeu-se a leitura das absorbâncias na leitora de placa a 550 nm (SOARES et al., 2007).

3.10 Infecção de macrófagos pré-tratados *in vitro* por *Leishmania amazonensis*

Em placa de cultivo de 24 poços, contendo lamínulas de 13 mm, foram adicionados 2×10^5 macrófagos/poço e incubou-se em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, por 4 horas, para adesão das células. Transcorrido este tempo, retirou-se o sobrenadantes e adicionou-se 400 µL de meio RPMI 1640 contendo diferentes

concentrações do extrato, frações e resina. Após incubação por 30 minutos, trocou-se novamente o meio e adicionou-se 2×10^6 leishmanias por poço.

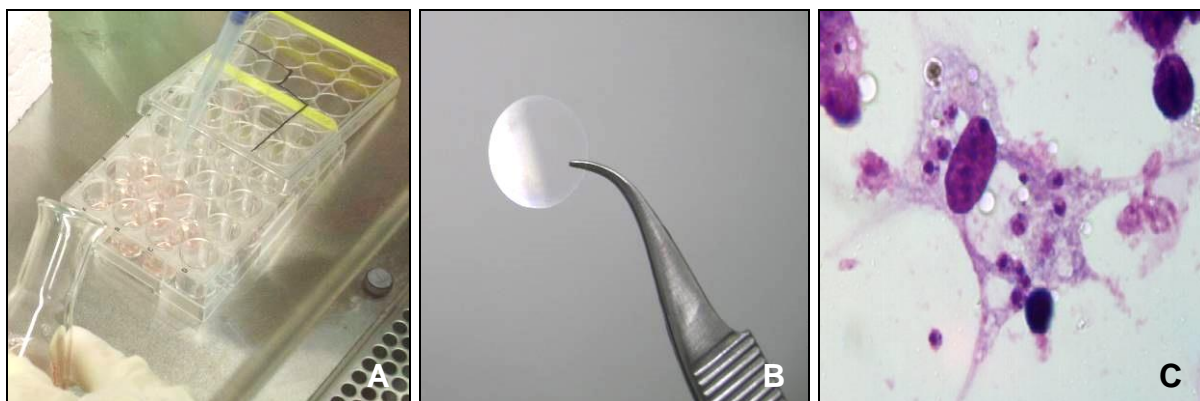


Figura 10: Cultivo de macrófagos *in vitro*. A: plaqueamento de macrófagos; B: lamínula contendo monocamada de macrófagos e C: visualização dos macrófagos infectados em microscopia óptica. MELO NETO, B., 2011. Fotografia digital.

Após 3 horas de incubação as lamínulas foram retiradas (Figura 10), coradas por Panótipo Rápido e o número de formas amastigotas internalizadas por macrófagos mensurado por visualização em microscopia óptica. Foram contados 100 macrófagos infectados por lamínula, conforme descrito por Soares et al. (2007).

3.11 Infecção de macrófagos *in vitro* por *Leishmania amazonensis* pré-tratadas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram incubadas com o extrato, frações e resina em valores iguais à metade das concentrações inibitórias médias para 24 horas (CI_{50} 24h). Decorridos 30 minutos em estufa BOD à temperatura de 26 °C, as formas promastigotas foram centrifugadas a 367 G e à temperatura de 4 °C durante 10 minutos. Em seguida, foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e adicionadas aos poços de placa de 24 poços com macrófagos previamente aderidos, em uma razão de 10 leishmanias por macrófago.

Após incubação da placa em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 durante 3 horas. as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas por Panótipo Rápido e proporção de macrófagos infectados avaliada, bem como a relação do número de formas amastigotas por macrófago. Foram contados 100 macrófagos infectados por lamínula, conforme descrito por Soares et al. (2007).

3.12 Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados obtidos, em triplicata, foi realizada utilizando-se programa Gráfico Prisma 5.0 e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância One way seguida pelo Teste de Bonferroni. A análise de significância foi considerada quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre macrófagos murinos

A citotoxicidade dos extratos e frações testados foi analisada pelo cálculo da concentração citotóxica média (CC₅₀) (Tabela 01).

Tabela 01: Concentrações do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. capazes de reduzir 50% da viabilidade dos macrófagos (CC₅₀) em 48 horas.

Tratamento		CC ₅₀ (µg/mL) 48 horas
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Extrato etanólico	> 100
	Fração acetato de etila	> 100
	Fração aquosa	> 100
	Fração hexânica	> 100
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March.	Resina	53,99 µg/mL

Observa-se que o extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. não apresentaram significativa toxicidade sobre macrófagos, já a resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. é capaz de reduzir 50% da viabilidade dos macrófagos com apenas 53,99 µg/mL.

4.2 Avaliação do efeito do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

A atividade anti-leishmania *in vitro* dos extratos e frações sob as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi avaliada pela observação da inibição do crescimento para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

Os resultados mostraram que ocorreu inibição do crescimento das leishmanias em todos os tratamentos utilizados, observando-se maior efetividade

para concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL, em 72 horas de incubação (Figura 11 a Figura 15).

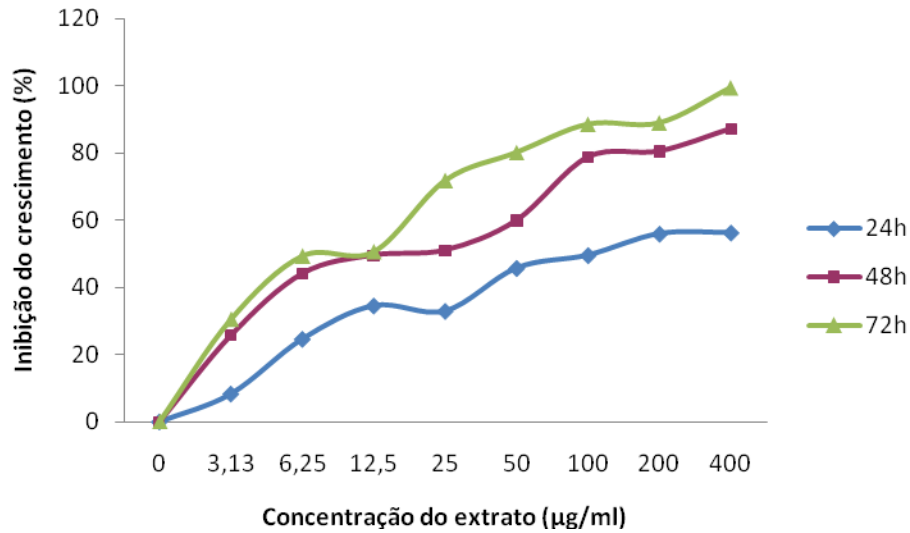


Figura 11: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

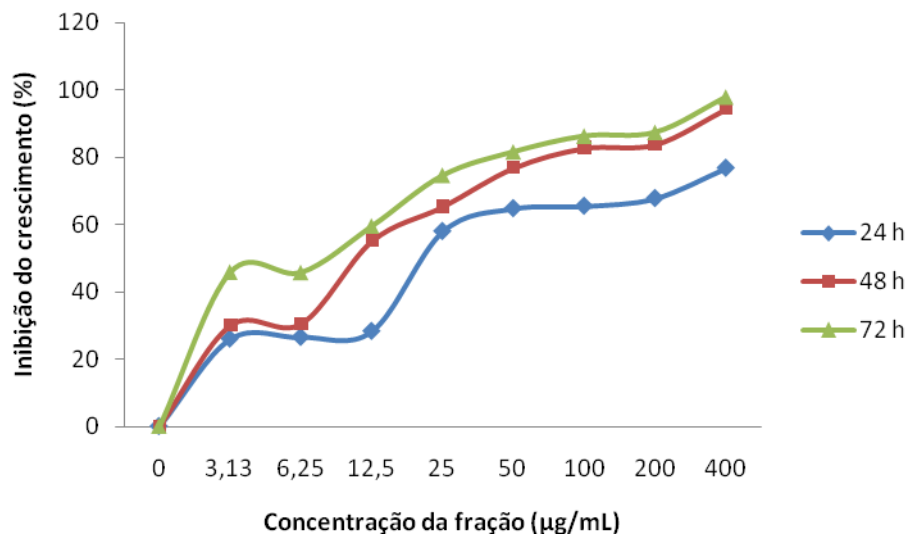


Figura 12: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

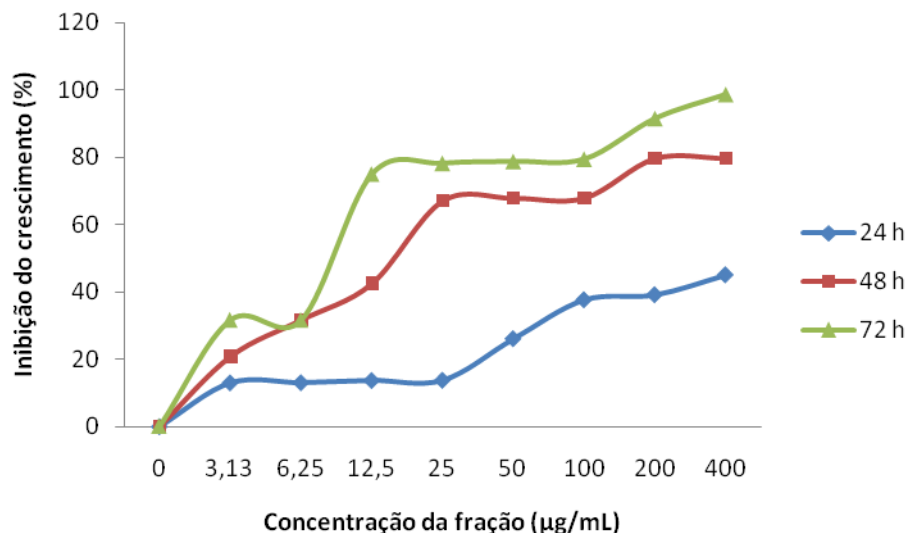


Figura 13: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

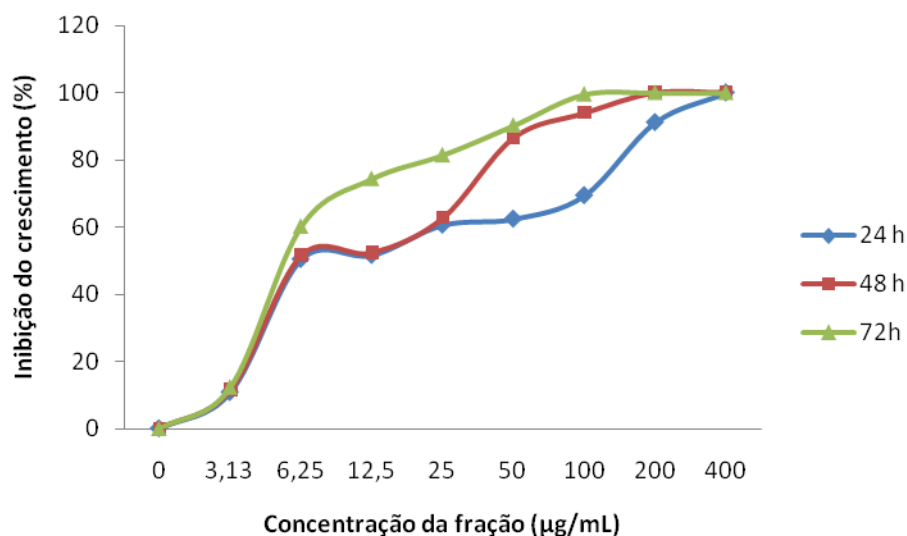


Figura 14: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

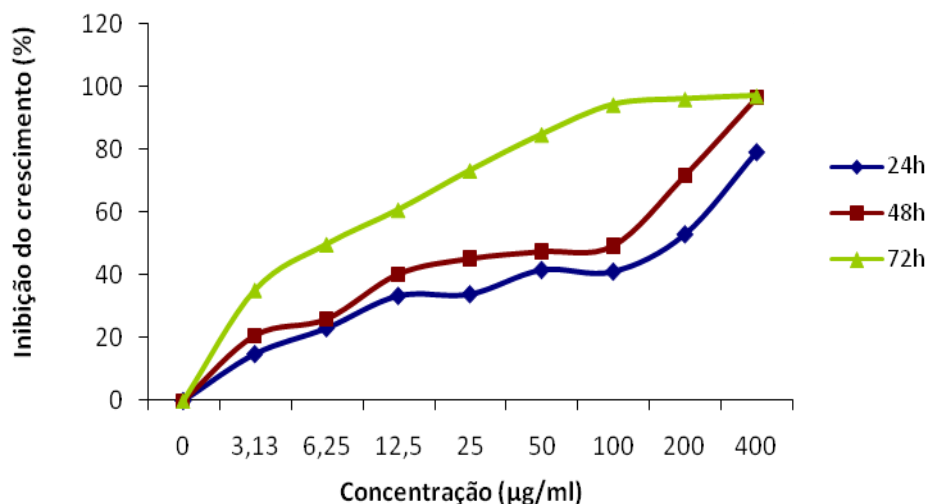


Figura 15: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

A partir destes resultados, pôde-se calcular a concentração inibitória média (CI_{50}) do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. para os mesmos tempos observados (Tabela 02).

Tabela 02: Concentrações inibitórias médias (CI_{50}) do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre o crescimento de *Leishmania amazonensis* após 24, 48 e 72 horas de incubação.

Tratamento	CI_{50} (µg/mL) ^a		
	24 h	48 h	72 h
Extrato etanólico de <i>Z. rhoifolium</i>	88,58 (50,87 – 166,69) ^b	16,41 (8,82 – 28,61) ^b	9,57 (4,33 – 18,25) ^b
Fração Ac. de etila de <i>Z. rhoifolium</i>	14,91 (10,68 – 24,97) ^b	13,93 (7,77 – 23,15) ^b	10,21 (5,89 – 16,57) ^b
Fração aquosa de <i>Z. rhoifolium</i>	> 300	25,45 (9,3 – 63,37) ^b	11,06 (2,75 – 30,08) ^b
Fração hexânica de <i>Z. rhoifolium</i>	19,24 (11,37 – 31,61) ^b	13,66 (7,68 – 23,24) ^b	7,96 (4,22 -13,93) ^b

	70,42 (44,60 – 31,61) ^b	56,43 (35,33 – 92,24) ^b	6,18 (3,39 -10,34) ^b
Resina de <i>Protium heptaphyllum</i>			

^a Concentração Inibitória capaz de inibir 50 % do crescimento das formas promastigotas.

^b Intervalo de confiança de 95 %

Utilizando-se dos valores de CI_{50} de 48h e CC_{50} , calculou-se o índice de seletividade para avaliar o nível de segurança dos mesmos frente a células mamíferas, visando futuro tratamento in vivo (Tabela 03). Esse índice representa a relação entre CC_{50} e CI_{50} .

Tabela 03: Relação entre a toxicidade do extrato, frações e resina para os macrófagos murinos (CC_{50}) e a toxicidade para o parasito (CI_{50}) - índice de seletividade.

Tratamento		Índice de seletividade
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Extrato etanólico	13,84
	Fração acetato de etila	27,64
	Fração aquosa	*
	Fração hexânica	9,78
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March.	Resina	0,96

(*) Não foi possível calcular ($CI_{50} > 300 \mu\text{g/mL}$)

4.3 Determinação de parâmetros de ativação de macrófagos

4.3.1 Ensaio de determinação do volume lisossomal

O aumento do volume lisossomal em macrófagos foi avaliado pela retenção de vermelho neutro dissolvido em DMSO. O vermelho neutro retido no lisossomo foi quantificado colorimetricamente e os valores mostrados à seguir (Figura 16 a Figura 20).

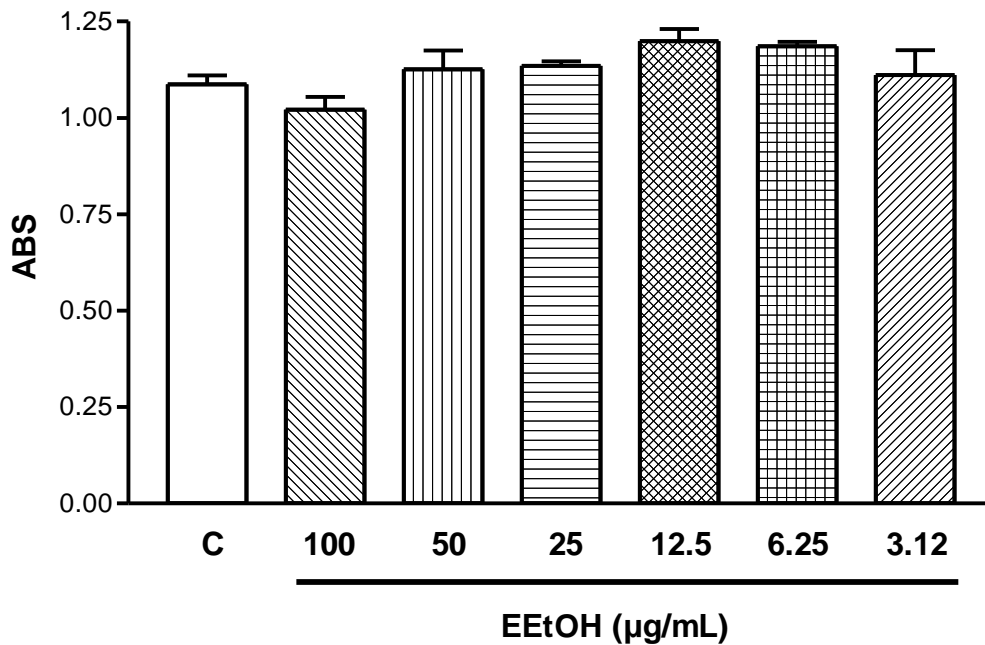


Figura 16: Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/ 10^6 células \cdot mL $^{-1}$ \pm e.p.m.

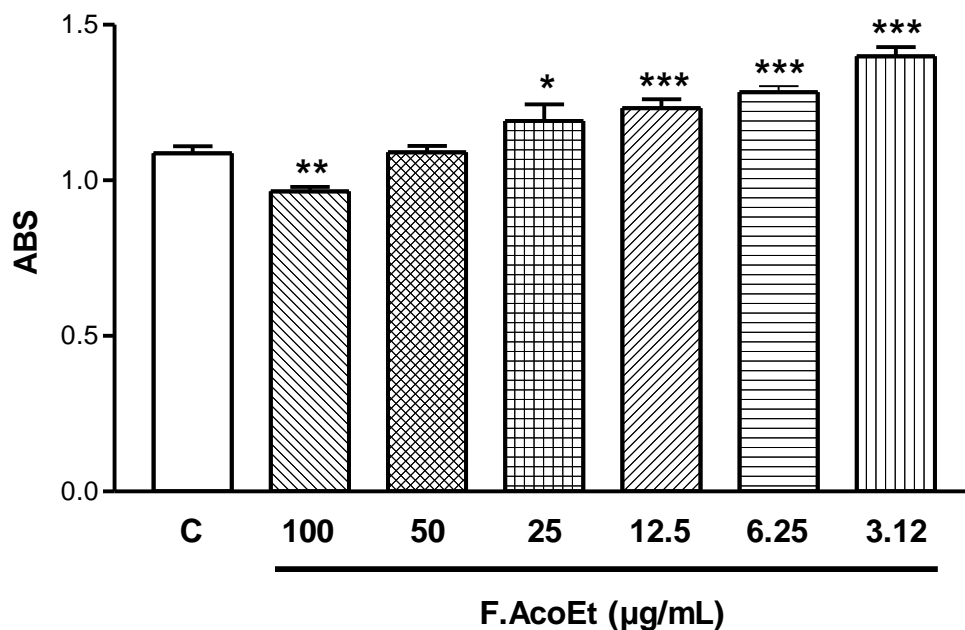


Figura 17: Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores

expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, comparado ao controle.

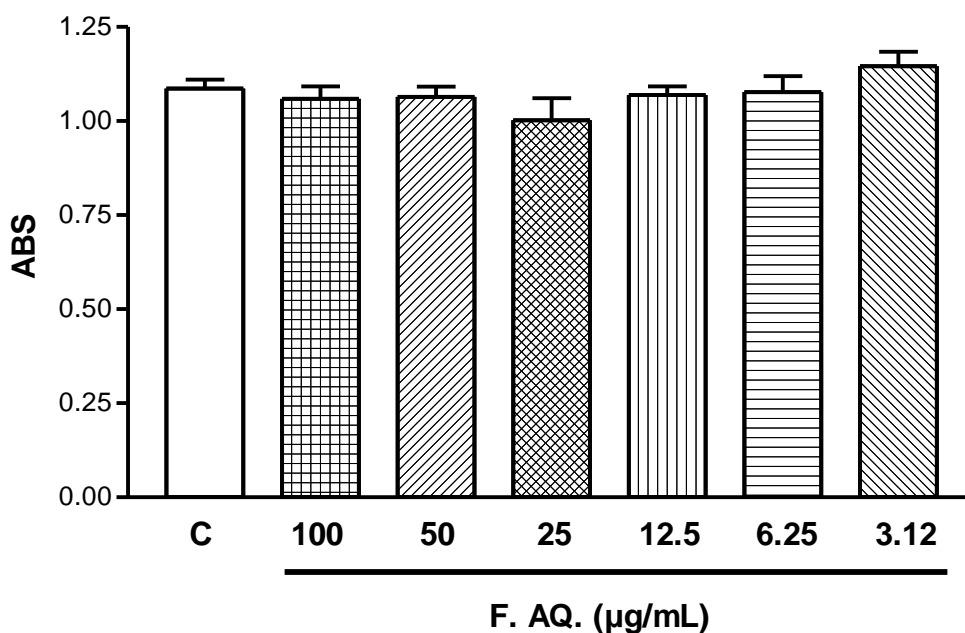


Figura 18: Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m.

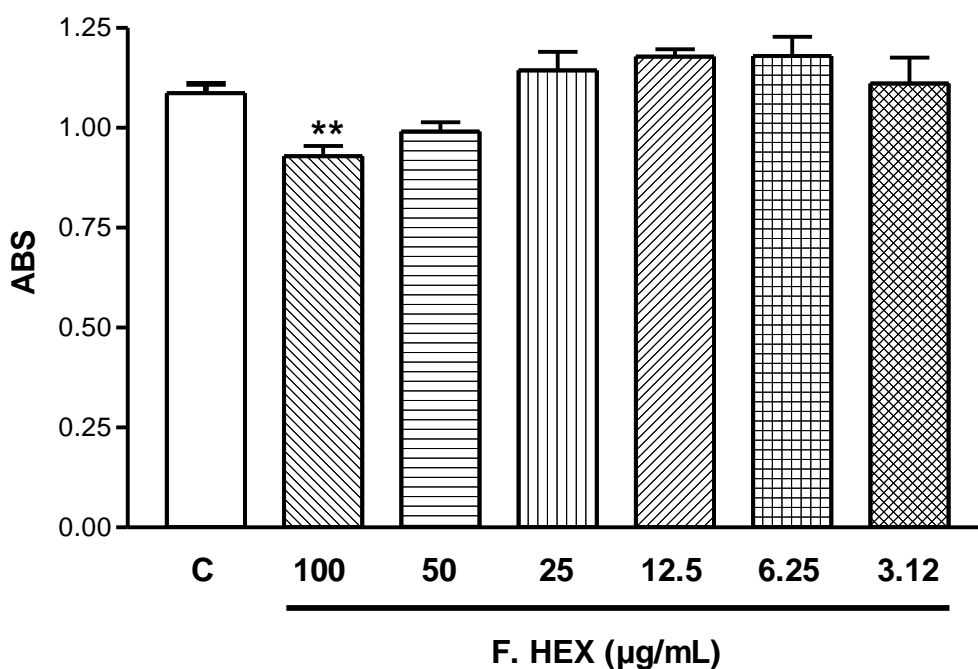


Figura 19: Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (**) p<0,01, comparado ao controle.

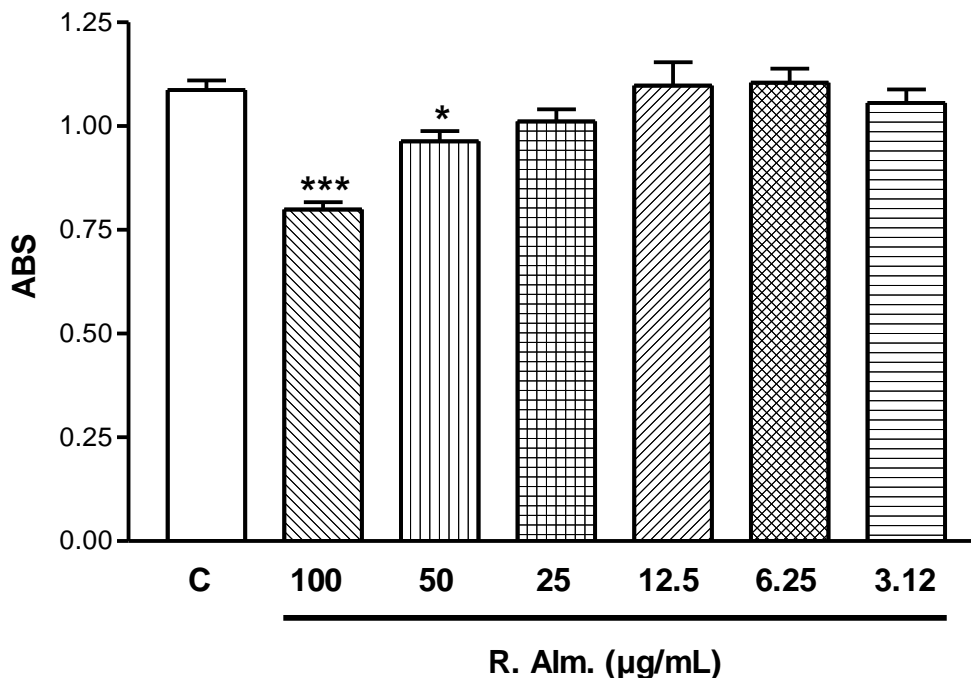


Figura 20: Retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.. Valores expressos como média das absorvâncias/ 10^6 células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$, comparado ao controle.

Destaca-se que F. AcoEt promoveu significativo incremento na retenção do vermelho neutro nas vesículas de secreção de macrófagos nas concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL, enquanto EEtOH, F. AQ, F. HEX e R. ALM não apresentaram tal efeito.

4.3.2 Ensaio de determinação da capacidade fagocítica

Outro parâmetro de ativação de macrófagos avaliado foi a resposta dessa célula frente a um estímulo externo. A capacidade fagocítica dos macrófagos foi mensurada colorimetricamente e os valores plotados abaixo (Figura 21 a Figura 25).

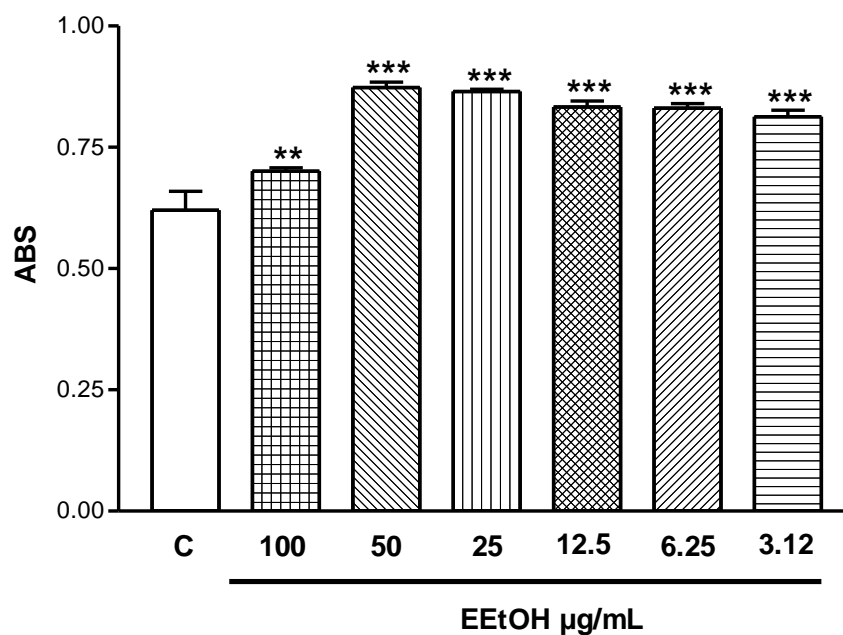


Figura 21: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/ 10^6 células $\cdot \text{mL}^{-1} \pm \text{e.p.m}$, considerando (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, comparado ao controle.

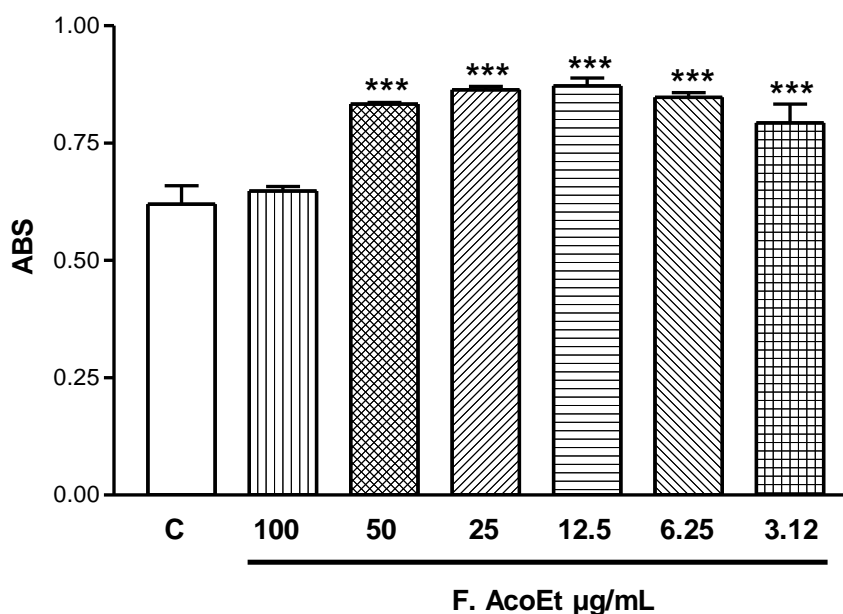


Figura 22: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/ 10^6 células $\cdot \text{mL}^{-1} \pm \text{e.p.m}$, considerando (***) $p < 0,001$, comparado ao controle.

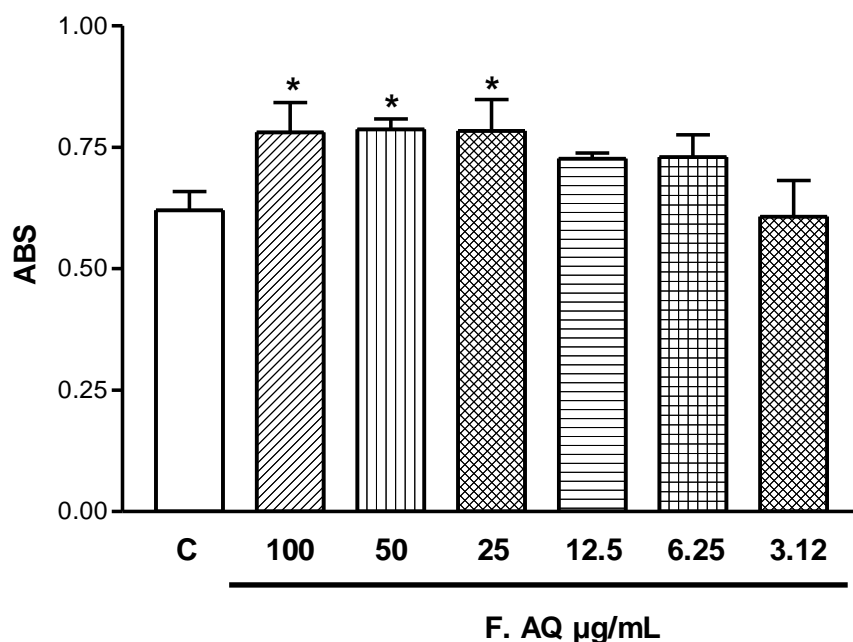


Figura 22: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/ 10^6 células $\cdot \text{mL}^{-1} \pm \text{e.p.m}$, considerando (*) $p < 0,05$, comparado ao controle.

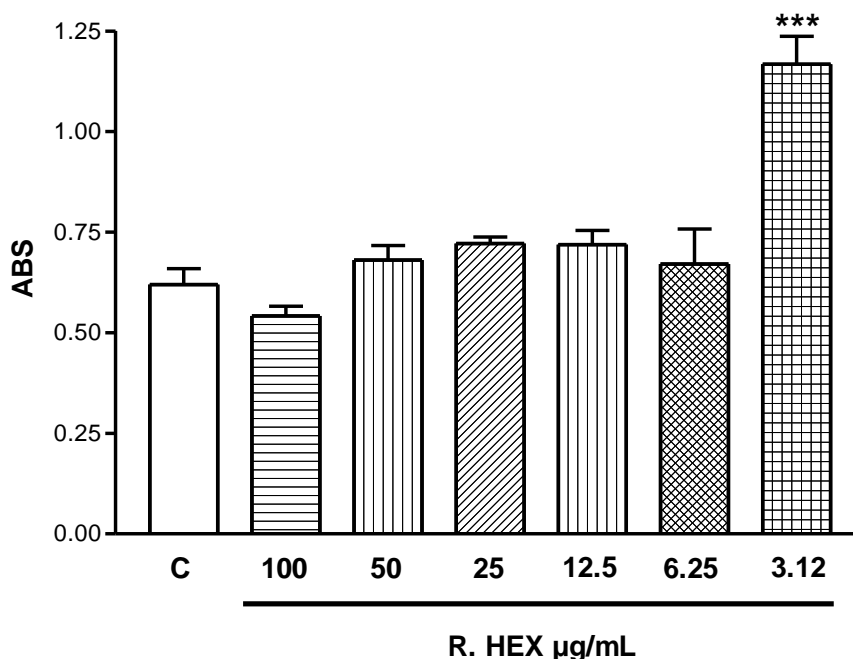


Figura 24: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Valores expressos como média das absorvâncias/ 10^6 células $\cdot \text{mL}^{-1} \pm \text{e.p.m}$, considerando (***) $p < 0,001$, comparado ao controle.

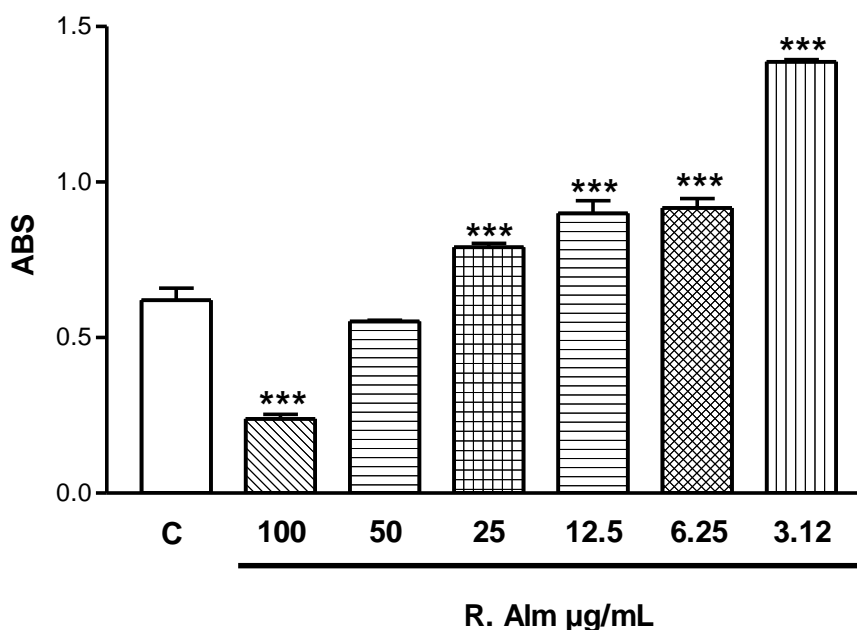


Figura 25: Fagocitose de partículas de zimozan pelos macrófagos tratados com resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.. Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (***) p<0,001, comparado ao controle.

Observa-se que o EEtOH e F. AcoEt estimularam a fagocitose das partículas de zimozan em praticamente todas as concentrações, enquanto que F. AQ apresentou elevações significativas apenas nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL e F. HEX apenas na concentração de 3,12 µg/mL. A R. ALM demonstrou ativação da fagocitose apenas nas concentrações menores que 25 µg/mL.

4.4 Quantificação de óxido nítrico liberado por dosagem colorimétrica de nitrito

A produção de NO é um fator importante no mecanismo de defesa dos macrófagos contra a infecção por leishmania. A determinação indireta do NO foi realizada pela dosagem de nitrito nos sobrenadantes em encontra-se mostrada a seguir (Figura 26 a Figura 31).

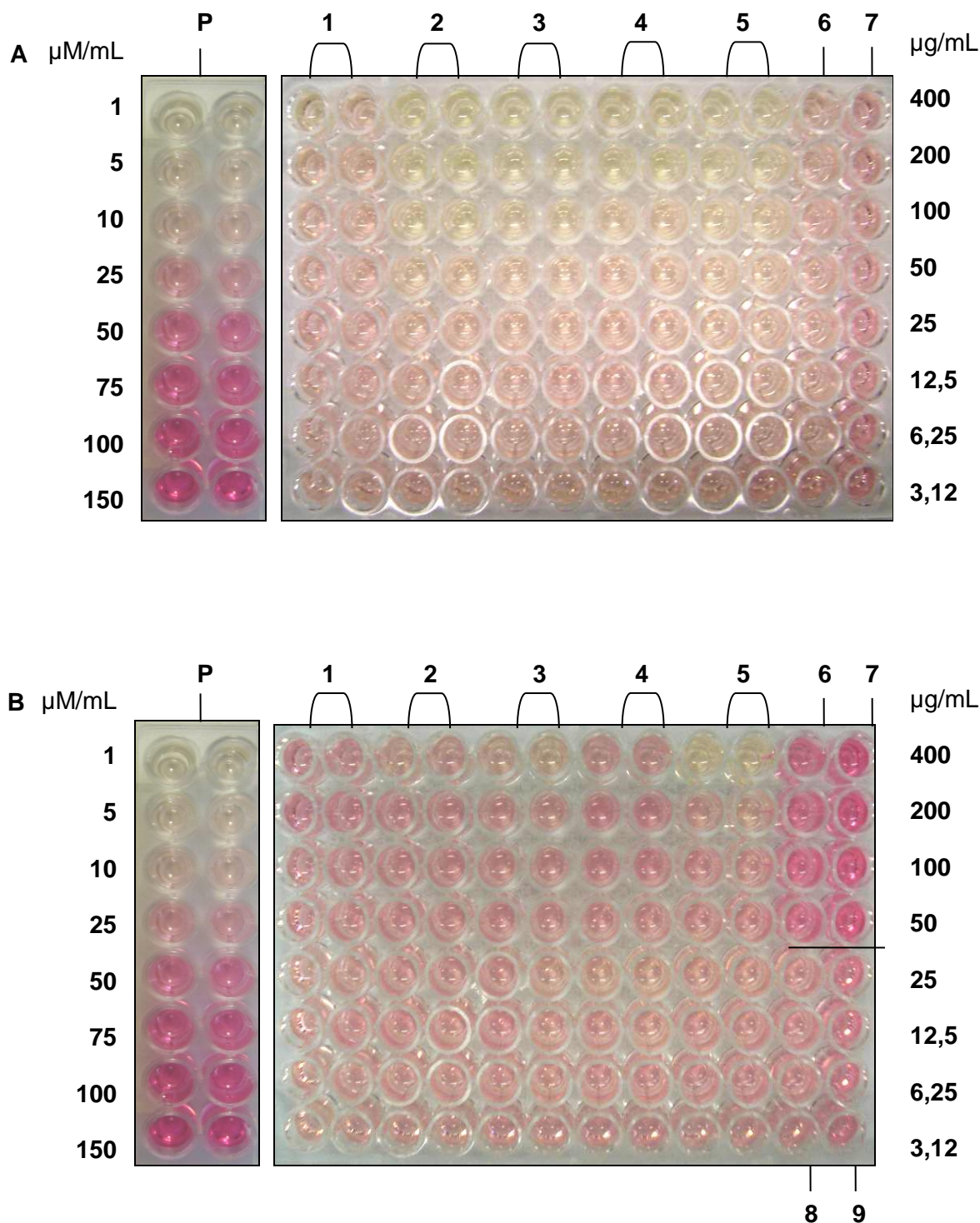


Figura 26: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados (A) e por macrófagos pré-tratados e estimulados por promastigotas (B). (P) padrão (1,0 a 150 $\mu\text{M/mL}$ de nitrito); (1) Fração aquosa; (2) Fração acetato de etila; (3) Fração hexânica; (4) Extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.; (5) Resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.; (6) Controle negativo; (7) Controle positivo, LPS - lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*; (8) Controle negativo + promastigotas; (9) Controle positivo + promastigotas. MELO NETO, B., 2011. Fotografia digital.

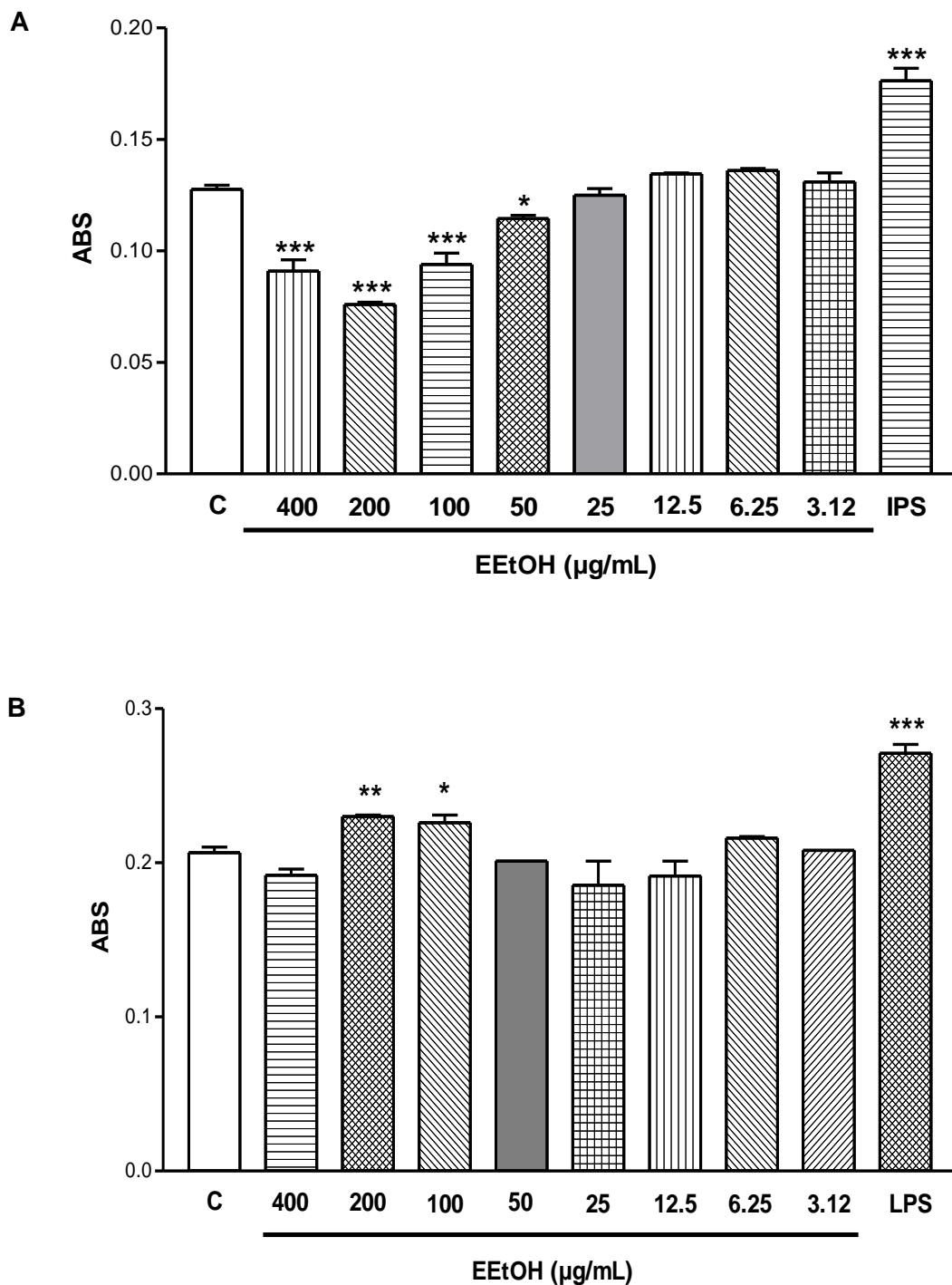


Figura 27: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B). Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (*) p<0,05, (***) p<0,001, comparado ao controle negativo (C). LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

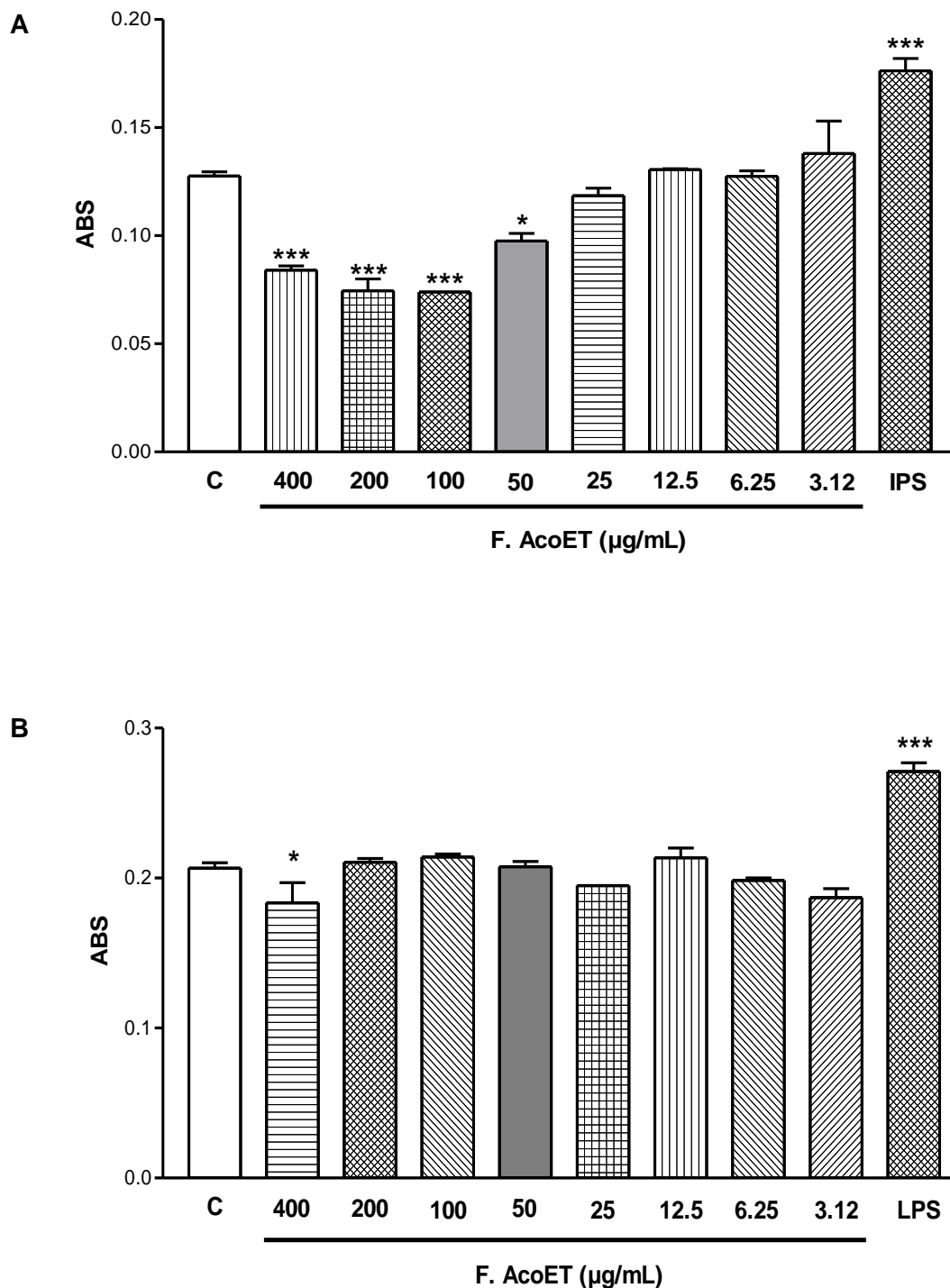


Figura 28: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B). Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (*) p<0,05, (***) p<0,001, comparado ao controle negativo (C). LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

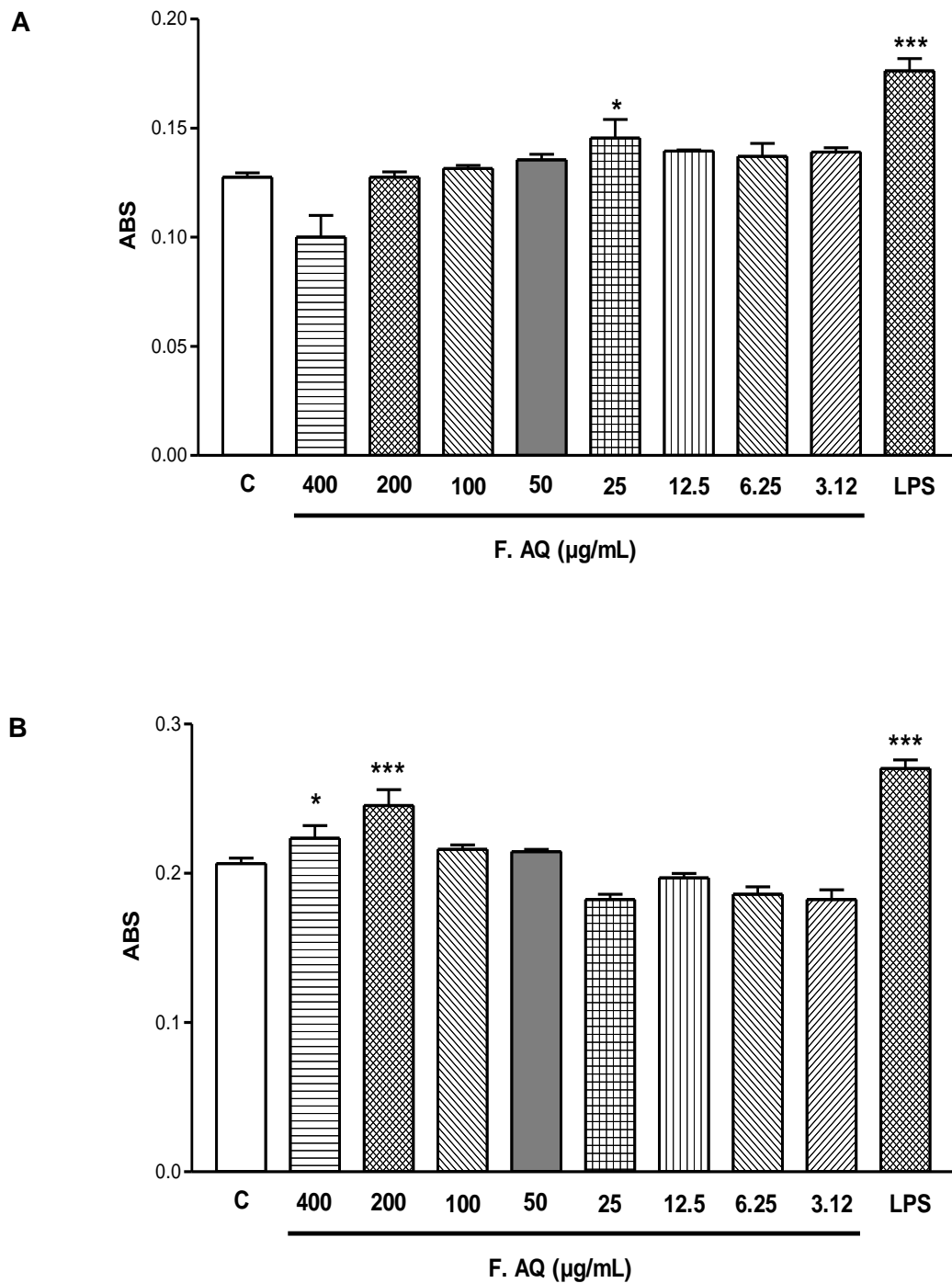


Figura 29: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B). Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (*) p<0,05, (***) p<0,001, comparado ao controle negativo (C). LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

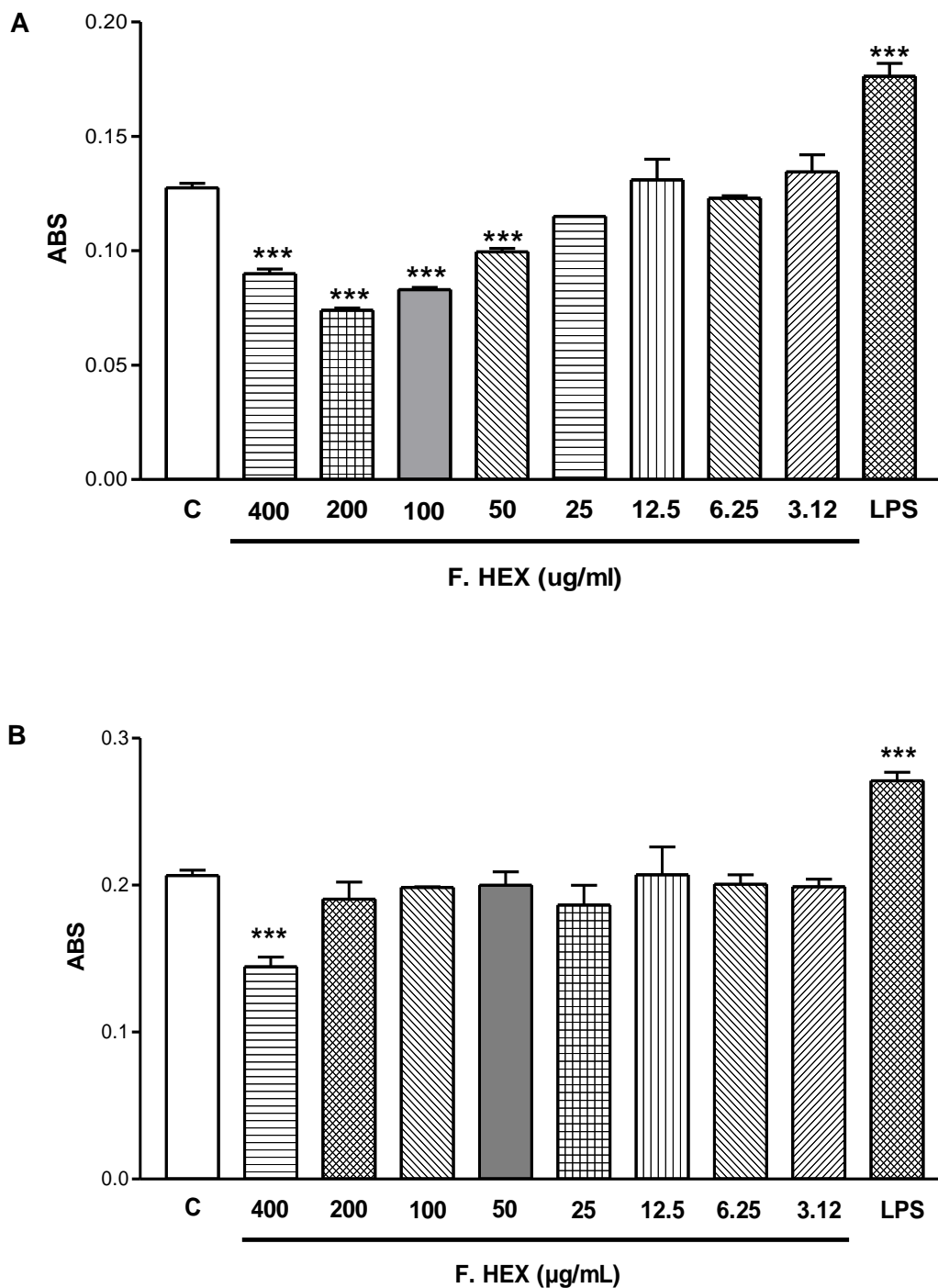


Figura 30: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (A) e macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B). Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (***) p<0,001, comparado ao controle negativo (C). LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

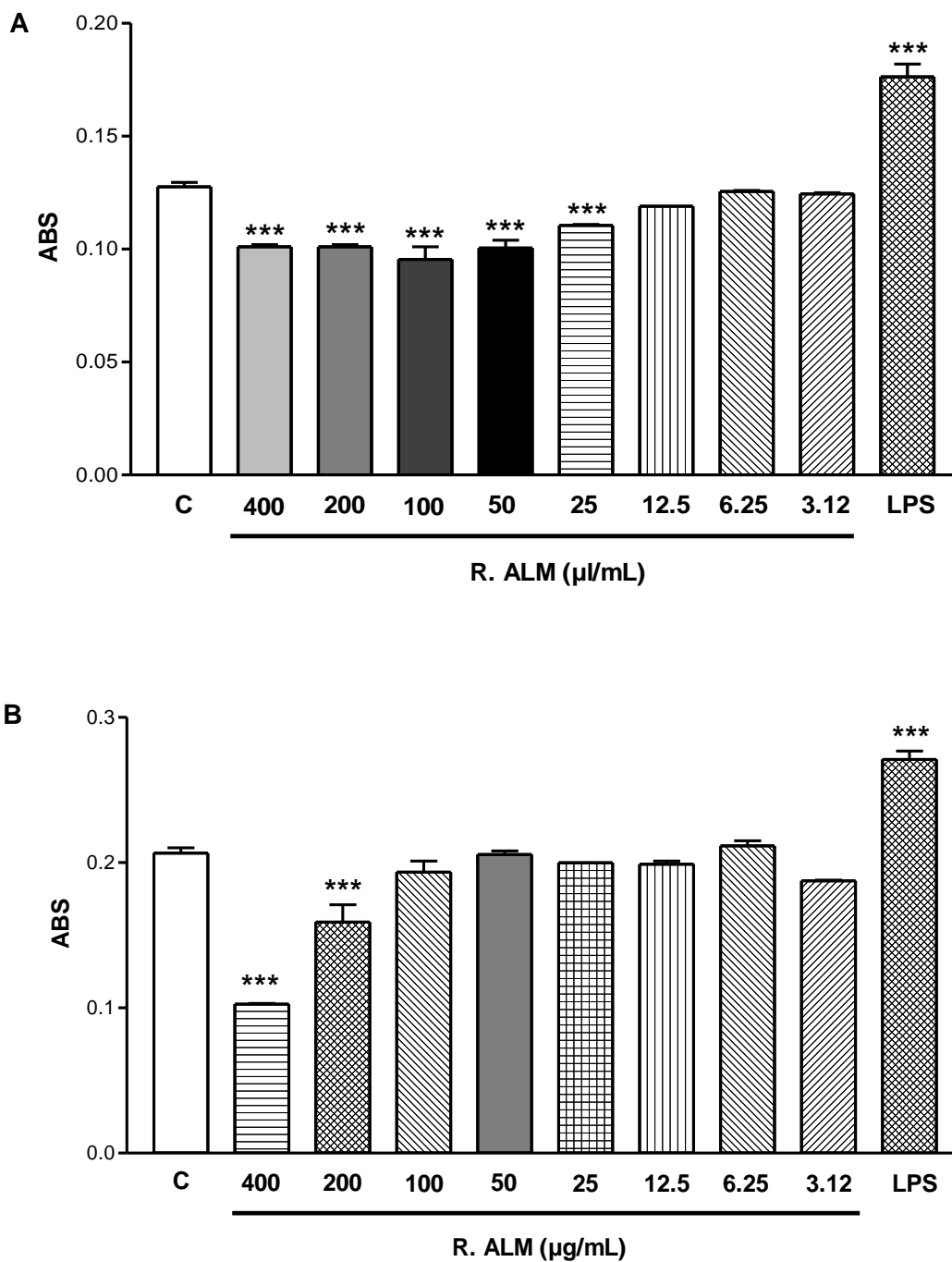


Figura 31: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (A) e macrófagos pré-tratados estimulados por promastigotas (B). Valores expressos como média das absorvâncias/10⁶ células . mL⁻¹ ± e.p.m, considerando (***) p<0,001, comparado ao controle negativo (C). LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

4.5 Infecção de macrófagos pré-tratados *in vitro* por *Leishmania amazonensis*

As figuras 32 a 37 mostram o efeito do pré-tratamento de macrófagos com o extrato, frações e resina realizado 30 minutos antes da infecção experimental com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

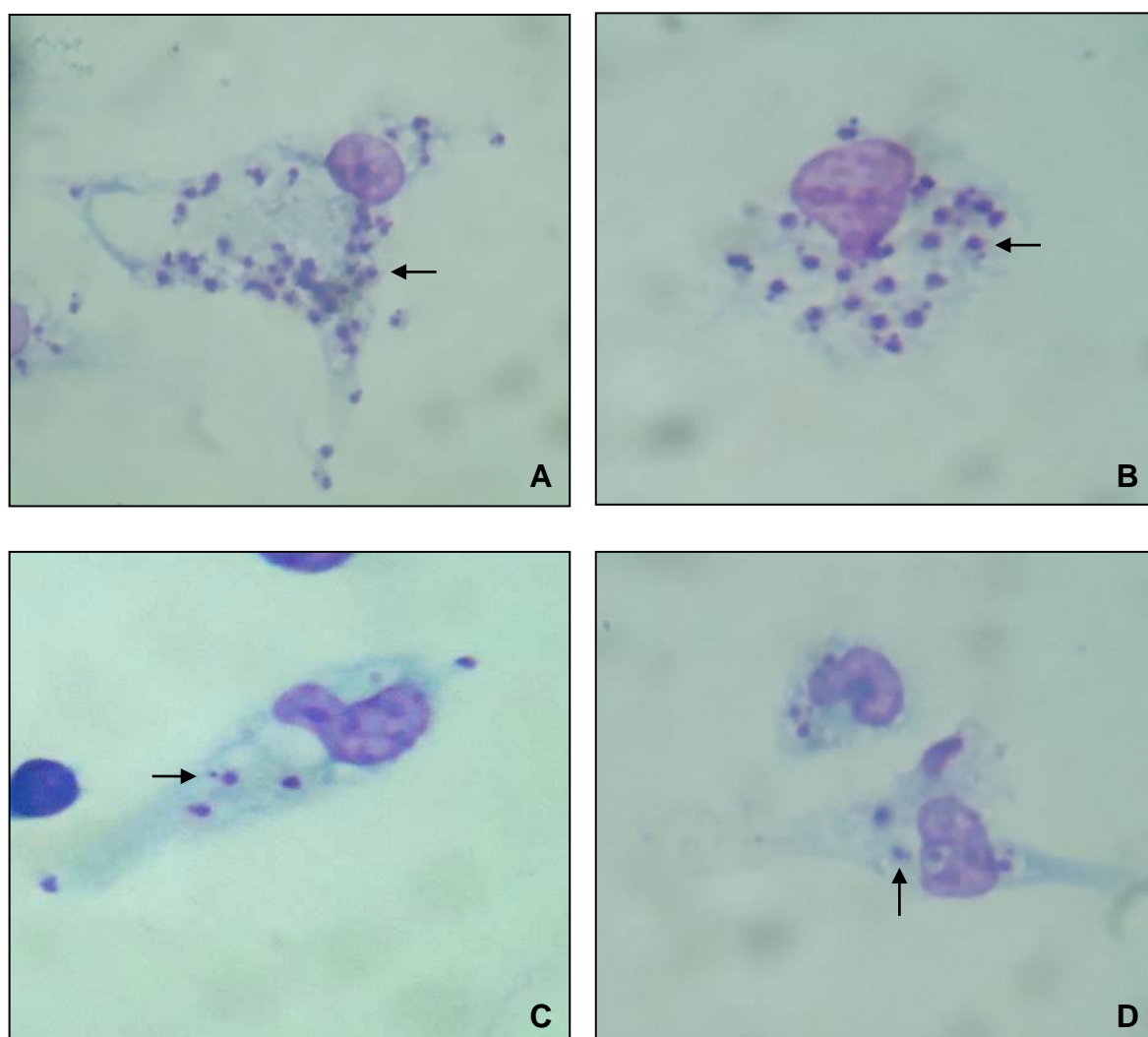


Figura 32: Microscopia ótica de cultivo de macrófagos (2×10^5 células/poço) infectados com *Leishmania amazonensis* (2×10^6 promastigotas/poço). As setas indicam formas amastigotas internalizadas evidenciando o núcleo celular e o cinetoplasto. A e B: macrófagos do grupo controle apresentando um maior número de formas amastigotas, C e D: macrófagos do grupo pré-tratados com F.AQ. 88,6 µg/mL. Aumento de 100X. MELO NETO, B., 2011. Fotografia digital.

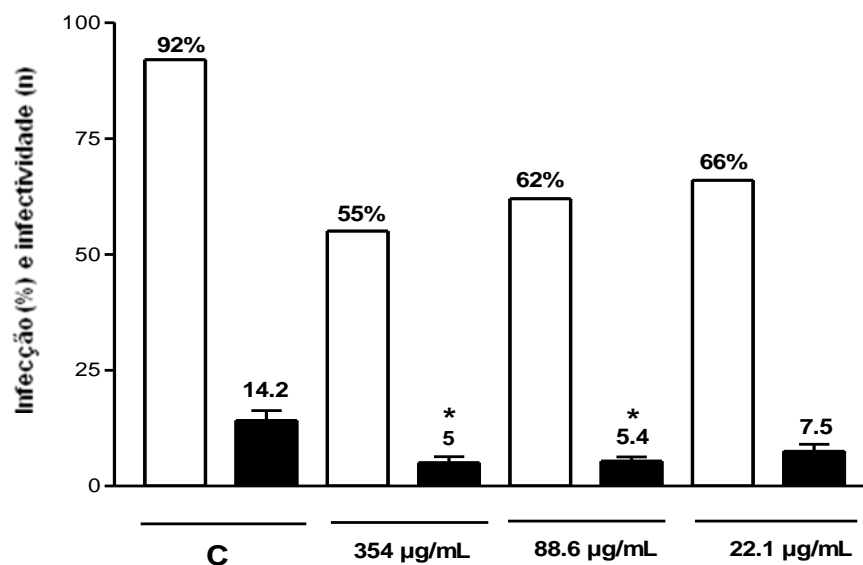


Figura 33: Efeito do pré-tratamento de macrófagos com extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (□) Percentual de infecção de macrófagos e (■) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média \pm e.p.m, considerando (*) $p < 0,05$, comparado ao controle.

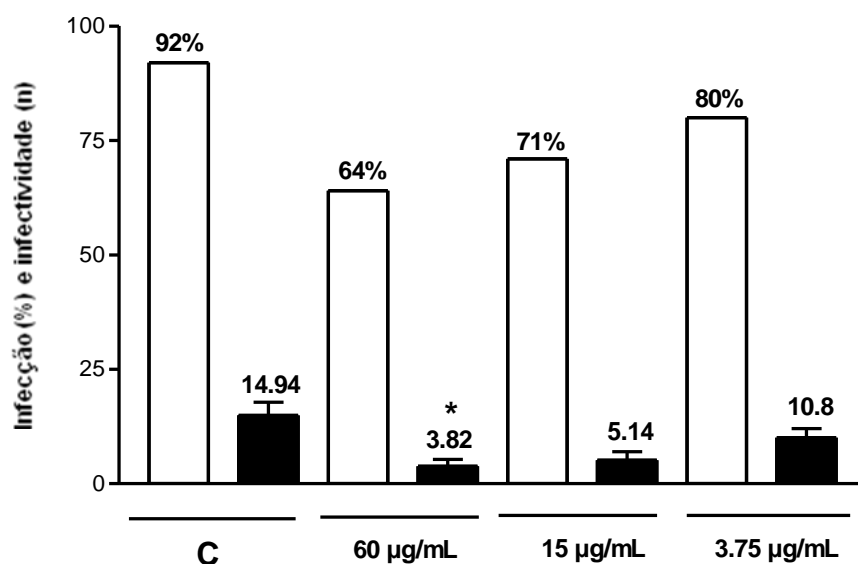


Figura 34: Efeito do pré-tratamento de macrófagos com fração acetato de etila de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (□) Percentual de infecção de macrófagos e (■) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média \pm e.p.m, considerando (*) $p < 0,05$, comparado ao controle.

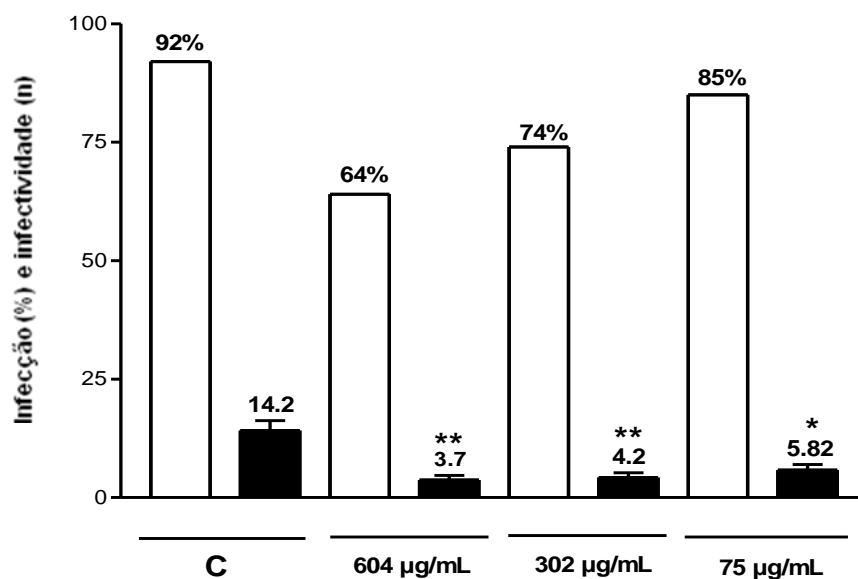


Figura 35: Efeito do pré-tratamento de macrófagos com fração aquosa de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (□) Percentual de infecção de macrófagos e (■) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média \pm e.p.m, considerando (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, comparado ao controle.

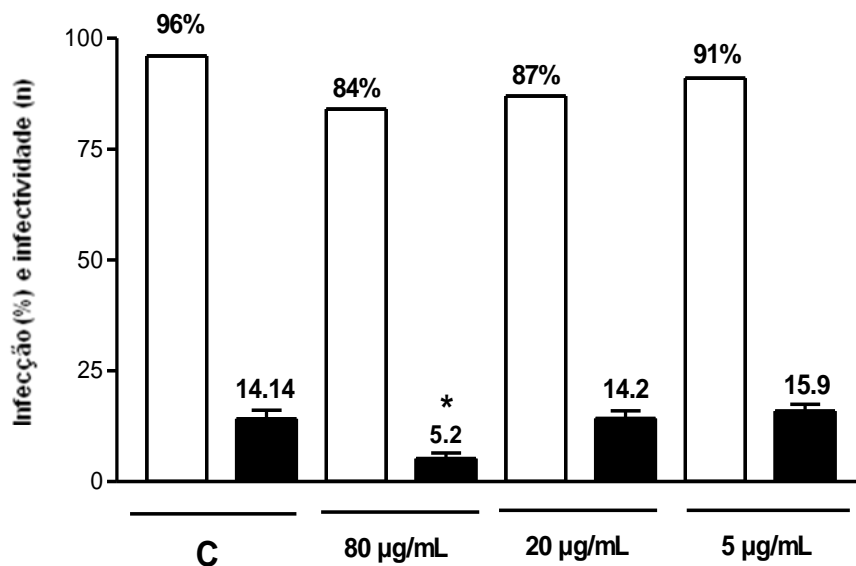


Figura 36: Efeito do pré-tratamento de macrófagos com fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (□) Percentual de infecção de macrófagos e (■) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média \pm e.p.m, considerando (*) $p < 0,05$, comparado ao controle.

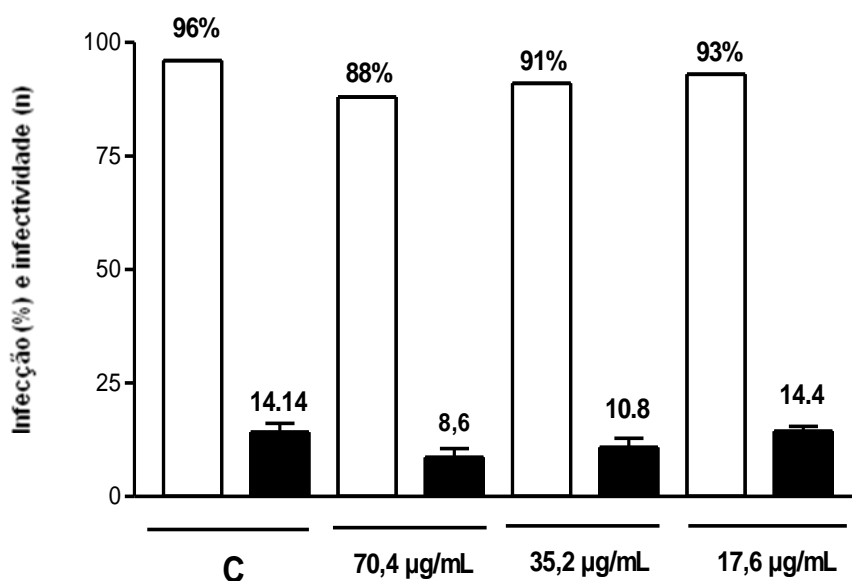


Figura 37: Efeito do pré-tratamento de macrófagos com resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.. (□) Percentual de infecção de macrófagos e (■) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média \pm e.p.m.

Neste protocolo, testou-se o EEtOH e F.HEX e F. AcoEt de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam nas concentrações referentes à CI_{50} de 24h e \pm 4x, F. AQ nas concentrações de CI_{50} de 24h, + 2x e - 4x e R.ALM nas concentrações de CI_{50} de 24h, - 2x e - 4x

Observando as imagens reproduzidas na Figura 32 verifica-se que os macrófagos pré-tratados apresentam um número reduzido de formas amastigotas internalizadas quando comparado com os macrófagos do grupo controle.

Os valores obtidos com a infecção por *Leishmania amazonensis* de macrófagos peritoniais pré-tratados revelam que ocorre expressiva queda, tanto no percentual de infecção, quanto no número de amastigotas por macrófago de forma concentração dependente. Os melhores resultados podem ser atribuídos para F. AcoEt e F. HEX pois têm as melhores reduções no número médio de amastigotas fagocitadas em relação à concentração testada.

4.6 Infecção de macrófagos *in vitro* por *Leishmania amazonensis* pré-tratadas

A figura 38 mostra o efeito de EEtOH (44 µg/mL), F.AcoET (7,5 µg/mL), F. AQ (151 µg/mL); F. HEX (10 µg/mL) e R. ALM (35,21 µg/mL) na interação de macrófagos com formas promastigotas pré-tratadas 30 minutos antes da infecção experimental

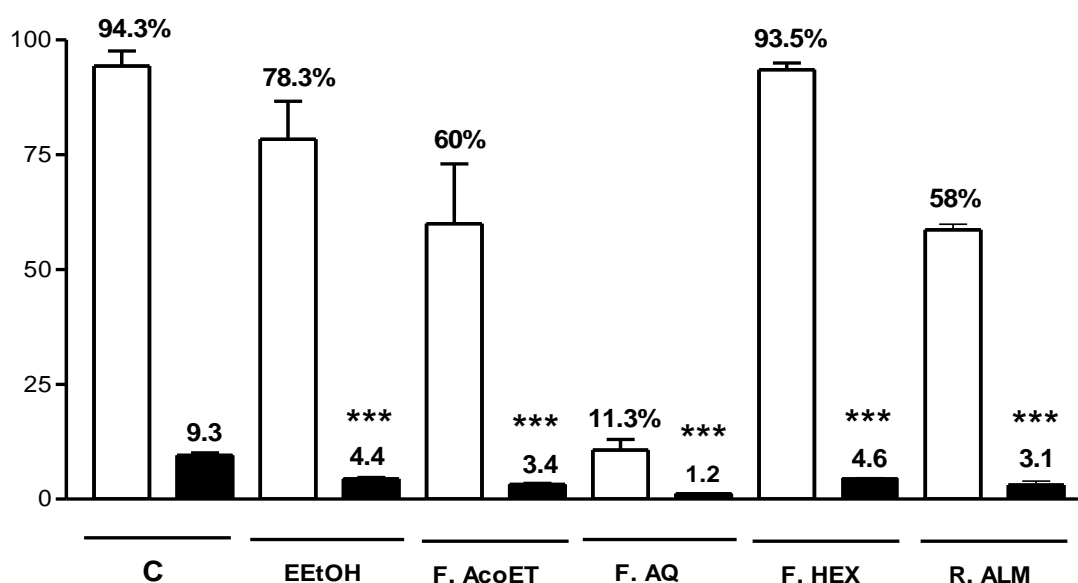


Figura 38: Efeito do pré-tratamento de leishmanias com extrato etanólico 44 µg/mL (EEtOH), frações acetato de etila 7,5 µg/mL (F.AcoET), aquosa 151 µg/mL (F. AQ) e hexânica 4 µg/mL (F. HEX) de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam e resina de resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. 35,21 µg/mL (R. ALM) sobre a infecção de macrófagos. (□) Percentual de infecção de macrófagos e (■) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média ± e.p.m, considerando (***) p<0,001, comparado ao controle.

O pré-tratamento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com o extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. com valores iguais à metade das concentrações inibitórias médias para 24 horas (CI₅₀ 24h) reduziu consideravelmente a infecção de macrófagos murinos. Evidencia-se a queda significativa do número de amastigotas internalizadas por macrófago nos grupos experimentais de forma diretamente proporcional à redução do percentual de células infectadas, sendo o melhor resultado absoluto atribuído para F. AQ na concentração de 151 µg/mL, com um percentual de apenas 11,3% de infecção e número médio de 1,2 amastigotas por macrófago. Ressalta-se que F. HEX, R. ALM e F. AcoET também obtiveram boa redução no número de amastigotas internalizadas.

5 DISCUSSÃO

As plantas medicinais são distribuídos em todo o mundo, mas elas são mais abundantes em países tropicais. Com aproximadamente 80.000 espécies descritas de plantas superiores, o Brasil oferece enormes perspectivas para a descoberta de novos compostos com propriedades terapêuticas (UEDA-NAKAMURA et al., 2006).

O extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e a resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. demonstraram efetiva atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* dependente de tempo e concentração, corroborando com dados de outras espécies encontradas na literatura. Martín-Quintal e colaboradores (2009) encontraram valores de CI_{50} 72h de 18 e 295 $\mu\text{g/mL}$ para frações hexânica e acetato de etila de *Tridax procumbens*. O óleo de *Copaifera reticulata* obteve CI_{50} 72h de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS et al., 2008). Alguns trabalhos também trazem valores de CI_{50} para *Leishmania chagasi*: 45,14 $\mu\text{g/mL}$ para *Plectranthus amboinicus*, 89,17 $\mu\text{g/mL}$ para *Plectranthus barbatus* e 62,67 $\mu\text{g/mL}$ para *Lippia Alba* (TEMPORE et al., 2008). Nossos melhores resultados de CI_{50} 72h foram verificados para a R. ALM e F. HEX, ambos ricos em terpenos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998, JÚNIOR et al, 2005, CARVALHO; SOUSA; CHAVES, 2009), e estes com conhecida ação leishmanicida (ARRUDA et al, 2005).

Sabendo-se da toxicidade do extrato, frações e resina para *leishmania*, deve-se também avaliar sua viabilidade sobre células mamíferas: os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para macrófagos são usuais na pesquisa por princípios ativos eficientes no tratamento das leishmanioses. Um dos métodos utiliza o composto conhecido como MTT que tem cor amarela e é solúvel em água. O MTT entra nas células pela membrana plasmática e, em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial, é oxidado a MTT-formazan, sal de cor arroxeadada e insolúvel em água. Assim, a oxidação de MTT é proporcional à atividade mitocondrial e, portanto, à viabilidade celular (LOOSDRECHT et al., 1991).

O extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. apresentaram valores de CC_{50} aceitáveis, acima dos valores de CI_{50} , no entanto R. ALM revelou relativa toxicidade para macrófagos. Esta correlação pode ser feita através do índice de seletividade, utilizando-se a razão de CC_{50} e CI_{50} de 48h, quando maior o valor encontrado, maior a segurança do extrato. A literatura recomenda que para formas

amastigotas internalizadas em macrófagos este índice deve apresentar-se superior a 20 (vinte) (NWAKA; HUDSON, 2006)

Os resultados mostraram que o EEtOH e F. AcoEt são os mais seguros para macrófagos, apresentando os maiores índices de seletividade e mostrando que o fracionamento propiciou a redução na toxicidade. O cálculo do índice de seletividade para F. AQ não foi possível pois suas CI_{50} e CC_{50} são muito elevadas.

Segundo Ghazanfari, Hassan e Khamesipour (2006) a ativação dos macrófagos é necessário para estabelecer o controle de infecção intracelular e a progressão da infecção por leishmania. As plantas, na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente, produzem um vasto número de substâncias com potencial antimicrobiano e/ou imunomodulador (IELPO et al., 2000). Os resultados do ensaio de determinação do volume lisossomal mostram que o tratamento dos macrófagos com F. AcoEt alterou o número e/ou volume das vesículas do compartimento endocítico, sugerindo o aumento no potencial de defesa dessas células. O mesmo não foi observado com os demais tratamentos. A redução das absorvâncias nas maiores concentrações (100 e 50 $\mu\text{g/mL}$) decorre da ação citotóxica do extrato, frações e resina, o que reduz o número de células viáveis.

A capacidade fagocítica dos macrófagos foi estimada pela incorporação de partículas de zimosan corado com vermelho neutro. Zimosan é um polissacarídeo preparado a partir da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na forma de pó insolúvel em água, com partículas de diâmetro médio de 3 μm .

Estudos *in vitro* tem demonstrado que o zimosan tem a capacidade de estimular células de defesa a induzir resposta imunológica do tipo Th1, inclusive com incremento na produção de IFN- γ (WEN-CHI et al., 2011)

Quando os macrófagos murinos foram estimulados com partículas de zimosan observou-se que houve um incremento na atividade fagocitária por todos os tratamentos, principalmente EEtOH e FAcEt. Os resultados denotam que estes extratos induzem a ativação frente a um agente externo, segundo Schwartz (2007) durante a fagocitose, muitos sistemas enzimáticos antimicrobianos são ativados dentro das vesículas fagocíticas com o intuito de digerir patógenos e/ou substâncias fagocitadas.

A F. AQ demonstrou aumento significativo na fagocitose de zimosan apenas nas concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$, já na F. HEX, este aumento só foi verificado na concentração de 3,12 $\mu\text{g/mL}$.

No tratamento por R. ALM observou-se um decréscimo na atividade fagocítica nas concentrações de 100 e 50 µg/mL devido a sua toxicidade (CC₅₀ de 53,99 µg/mL), no entanto, nas demais concentrações o estímulo mostrou aumento dependente da concentração.

Na atividade anti-leishmania, uma das vias que pode está envolvida é a produção do ON pelos macrófagos. Ele é considerado, há muito tempo, como o mecanismo mais eficaz envolvido na defesa contra leishmania (GREEN et al., 1990; BOGDAN; RIILLINGHOFF, 1998). O parasita sobrevive dentro do macrófago mediante a habilidade de inibir a expressão ou atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) através da inibição da produção de citocinas envolvidas na regulação da iNOS, inibição da síntese de NO por glicosilinositol fosoflipídios da superfície de amastigotas ou estímulo à produção do fator de transformação do crescimento TGF-β (AEDO, 2007).

Dentre o extrato, frações e resina testados, observou-se que, isoladamente, os mesmos não apresentaram influência na produção de NO por macrófagos. No entanto, após estímulo por infecção por promastigotas, EEtOH e F. AQ aumentaram de forma significativa a produção de nitrito pelos macrófagos nas concentrações entre 100 e 400 µg/mL, indicando que um dos mecanismos envolvidos na atividade leishmanicida evidenciada por estes tratamentos é o estímulo à produção de NO. Este achado é de grande importância, pois indica que os tratamentos utilizados promovem nas células murinas o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1, relacionada com a regressão da doença *in vivo*.

No tocante a influência do pré-tratamento de macrófagos ou de leishmanias observou-se notável redução na internalização das formas promastigotas e conseqüente transformação em amastigotas. Nos grupos onde os macrófagos foram tratados, verificou-se a redução no percentual de infecção e no número de amastigotas internalizadas de forma dependente da concentração, sendo os níveis de significância mais elevados nas maiores concentrações,

Apesar de cada tratamento ter sido realizado em concentrações diferentes, pode-se notar que F. AcoEt obteve os melhores resultados, empregando-se as menores concentrações, obtendo uma inibição de 25,43 % no número de parasitos internalizados na concentração de 60 µg/mL. F. HEX também demonstrou bons resultados com redução de 36,77% no número de amastigotas na concentração de 80 µg/mL. Podemos comparar nossos resultados com recentes dados publicados

por Afonso-Cardoso e colaboradores (2011), onde verificou-se uma inibição de 55,7; 65,5 e 45,3% na infecção de macrófagos pré-tratados com 100, 50 e 10 µg/mL de lecitina isolada do látex de *Synadenium carinatum*.

O pré-tratamento de promastigotas também reduziu significativamente a infecção de macrófagos peritoneais. Novamente, F. AcoEt, F. HEX, além de R. ALM obtiveram os melhores índices na redução da carga parasitária por célula, no entanto, para F. HEX o percentual de células infectadas continuou alto com valor próximo ao controle.

Estas evidências indicam que os tratamentos utilizados modificam a interação parasita-hospedeiro, incrementando os mecanismos de defesa, como a produção de NO e reduzindo as taxas de infecção e infectividade.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que:

✓ O extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. apresentam pequena toxicidade para macrófagos murinos, sendo sua utilização segura, ao contrário da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. que apresentou considerável citotoxicidade;

✓ O extrato, frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e a resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. exercem significativa ação contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo portando possíveis candidatos ao tratamento da Leishmaniose;

✓ A investigação dos parâmetros de ativação de macrófagos indicam que o extrato, frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e a resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. promovem o incremento na ativação e capacidade fagocítica de macrófagos;

✓ O pré tratamento de macrófagos ou leishmanias com extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam reduziram o índice de infecção e a infectividade das células murinas, sendo tais parâmetros incrementados pelo fracionamento do EEtOH;

✓ A redução na infecção e infectividade de macrófagos tratados parece estar relacionada pela indução na produção de NO pelas células murinas.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Investigar a ação dos tratamentos utilizados em modelos de Leishmaniose *in vivo*.
- ✓ Avaliar a ação citotóxica e antileishmania de substância isoladas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March..
- ✓ Avaliar os parâmetros de resposta imunológica de substância isoladas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March..
- ✓ Avaliar a produção de interleucinas por macrófagos estimulados por promastigotas.
- ✓ Investigar por microscopia eletrônica as alterações provocadas pelos extratos nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

REFERÊNCIAS

AEDO, J. R. N. G. Atividade de álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2007.

AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUSA, M. A. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 61–67, 2011.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Brazilian. **Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.3, p. 472-508, 2008.

AMARAL, M. P. M.; BRAGA, F. A. V.; PASSOS, F. F. B.; ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, R. C. M.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A. Additional Evidence for the Anti-inflammatory Properties of the Essential Oil of *Protium heptaphyllum* Resin in Mice and Rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 775-82, 2009.

ARAGÃO, G. F. CARNEIRO, L. M.; JUNIOR, A. P.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 827-834, 2006.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679–1687, 2005.

BOGDAN, C.; RIILLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.

BONATTO S. J. R. Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito *in vitro* do óleo de peixe sobre as células tumorais. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília (DF), 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília (DF), 2006.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMELO, F. B.; SOUSA, C. M. M.; GONZAGA, W. A.; CHAVES, M. H. Estudo químico e farmacológico de *Zanthoxylum rhoifolium*. **XIV Seminário de Iniciação Científica da UFPI**, p. 353-354, 2005.

CARVALHO, A. C.; SOUSA, C. M. M.; CHAVES, M. H. Óleo essencial de *Protium heptaphyllum*: fracionamento e identificação. Sociedade Brasileira de Química. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

CECHINEL-FILHO, Y.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, n. 21, v. 1, p. 99-105, 1998.

CITÓ, A. M. G. L.; COSTA, F. B.; LOPES, J. A. D.; OLIVEIRA, V. M. M.; CHAVES, M. H. Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p.4-7, 2006.

COÊLHO, Z. C. B; TEIXEIRA, M. J.; MOTA, E. F.; FRUTUOSO, M. S.; SILVA, J. S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; POMPEU, M. M. L. *In vitro* initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.5, p. 476-482, 2010.

CORREIA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

Da SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p.180–188, 2007a.

Da SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 281-285, 2007b.

DANELLI, M. G. M.; SOARES, D. C.; ABREU, H. S.; PEÇANHA, L. M. T.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. **Phytochemistry**, v.70, p.608-614, 2009.

DESJEUX, P. Global control and leishmania and HIV co-infection. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 317-325, 1999.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infection: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 4–15, 2003.

ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; TANGO PISANGO, M.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G; SAUVAIN, M. Evaluation of the

leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 254–259, 2007.

FERNANDES, T. T., SANTOS, A. T. F., PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* E *Guazuma ulmifoli*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L.L.; FILHO, L. G.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

GHAZANFARI, T.; HASSAN, Z. M.; KHAMESIPOUR, A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium Sativum*) treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p.333–337, 2006.

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

GREEN, S. J.; MELTZER JR., M. S.; HIBBS, J. B.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracelular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 278-283, 1990.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. B. C.; SANTOS, R. R.; SANTOS, W. L. C.; SOARES, M. B. P. Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania* sp. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 945-949, 2010.

HERNÁNDEZ-CHINEA, C *Leishmania amazonensis*: Humoral response to amastigote excreted-antigens in murine leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 492–496, 2007.

HIMMELRICH. H.; LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; BIEDERMANN, T.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOCKSLEY, R. M.; RÖCKEN, M.; LOUIS, J. A. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and suffifi cient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 4819-4825, 2000.

IELPO, M.T.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M. M. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 71, p. 101-109, 2000.

JULLIAN, V.; BONDUELLE, C.; VALENTIN, A.; ACEBEY, L.; DUIGOU, A.; PRÉVOST, M.; SAUVAIN, M. New diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacortinaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5065-5070, 2005.

JULLIAN, V.; BOURDY G.; GEORGES, S.; MAUREL, S.; SAUVIAN, M. Validation of use a traditional antimalarial remedy from French Guiana *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 348-352, 2006.

JÚNIOR, G. M. V.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

JÚNIOR, G. M. V.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 288–292, 2001.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 66, n. 1, p. 71-74, 1991.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.2, p. 111-124, 2007.

LOOSDRECHT, V.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H. J.; LANGENHUIJSEN, M. M. A. C. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **The Journal of Immunological Methods.**, v. 141, p. 15-22, 1991.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa- SP: Ed. Plantarum. p. 312, 1992.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. (Bourseraceae): caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.

MARTÍN-QUINTAL, Z.; MOO-PUC, R.; GONZÁLEZ-SALAZAR, F.; CHAN-BACAB, M. J.; TORRES-TAPIA, L. W.; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R. In vitro activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 463-467, 2009.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p. 168-173, 2010.

MONZOTE, L.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; JUAN, A. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.49, n.4, p. 257-260, 2007.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Evaluation of selected tropical seaweeds for *in vitro* anti-trichomonal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120 p. 92–97, 2008.

MURBACK, N. D. N.; HANS FILHO, G.; NASCIMENTO, R. A. F.; NAKAZATO, K. R. O.; DORVAL, M. E. M. C. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia** ,v. 86, n.1, p. 55-63, 2011.

NICOLETTI, S.; SEIFERT, K.; GILBERT, I. H. *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide-amphotericin B (HPMA-AmB) copolymer conjugates as antileishmanial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 441-448, 2009.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeito Citotóxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 50-53, 2007.

NWAKA, S; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 5, p. 941-955. 2006.

OLIVEIRA, D. M. Avaliação de Modelos de Infecção Visceral Causada por *Leishmania (Leishmania) Chagasi* em Camundongos Balb/C: detecção do Parasita no Parênquima Cerebral dos Animais. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2010.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA, R. C. P.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by a- and h- amyriin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Science**, v.77, p. 2942-2953, 2005.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, FLORÊNCIO, M.G.; LIMA, R.C.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO V.S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resina from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 105-111, 2004.

PARRA, M.G.; FIDALGO, L. M.; MARTINEZ, J. M.; ALVAREZ, A. M. M.; IGLESIAS, O. V. Leishmanicidal activity of *Echinaster (Othilia) echinophorus* crude extract. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.52, n.2, p. 89-93, 2010.

PEREIRA, S. S.; LOPES, L. S.; MARQUES, R.B.; FIGUEIREDO, K.A.; COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2 p. 227-231, 2010.

RATES S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603- 613, 2001.

REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; SOUSA, M. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismos Imunológicos na resposta celular humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

ROCHA, F. F.; CAMPOS, M. G. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.52, n.6, p. 389-389, 2006.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, . v. 209, p. 1-7, 2002.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

SANTANA, L. C. L. R. Avaliação das atividades anti-leishmania, citotóxica e indutora da síntese de óxido nítrico de amostras de própolis e pólen. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), **Universidade Federal do Piauí**, Teresina, 2009.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 204–208, 2008.

SCHWARTZ, C. A lecitina vegetal KM+ induz a ativação de Neutrófilos humanos com consequente aumento na capacidade fagocítica e microbicida. Dissertação de mestrado. **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, Curitiba, 2007.

SCOTT, P.; FARREL, J. P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. **Chemical Immunology**, v. 70, p. 60-80, 1998.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F.; MENEZES-DE-LIMA, O. JR.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G.; HENRIQUES, M. G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.57-69, 1999.

SILVA, M. S .A.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. C. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p.236-240, 2008.

SIQUEIRA, E. P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SOBRAL, M. E. G.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.20, n.3, p. 416-421, 2010.

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

SOARES, C. D.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, A. A.; SARAIVA, E. A. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOUZA, A.A., WIEST, J.M. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n. 3, p. 23-29, 2007.

TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F. O; CALIXTO, I. A. R. L.; LORENZI, H.; MELHEM, M. S. C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 443-449, 2008.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of parthenolid, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 176-182, 2005.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; KOREHISA, P. M.; PRADO, D. F. B.; APARÍCIO, G. C. D.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

VEIGA-JUNIOR V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

WEN-CHI, W.; SU, Y. H.; CHEN, S. S.; SHEU, J. H.; YANG, N. S. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. **Cytokine**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva, WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Provisional agenda item 12.3. Sixtinth world health assembly**. Geneva: WHO, 2006.

ZANON, G.; WEBER, A. D.; STUKER, C. Z.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Atividade antimicrobiana de *Zanthoxylum rhoifolium*. Sociedade Brasileira de Química. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008.