



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
“PROF. PAULO HUMBERTO MOREIRA NUNES”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Platonia insignis Mart.: ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ANTIBACTERIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES OBTIDAS DA CASCA DO CAULE

ADRIANA CUNHA SOUZA

TERESINA – PI

2016

ADRIANA CUNHA SOUZA

Platonia insignis Mart.: ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ANTIBACTERIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES OBTIDAS DA CASCA DO CAULE

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

TERESINA – PI

2016

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

Souza, Adriana Cunha.

S719p *Platonia insignis* Mart. : atividade antileishmania e antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidas da casca do caule / Adriana Cunha Souza. -- Teresina, 2016.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2016.

“Orientação : Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.”

Bibliografia

1. *Leishmania amazonensis*. 2. *Platonia insignis* Mart. 3. Citotoxicidade. 4. Antileishmania. 5. Antibacteriano. I. Título II. Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.32

ADRIANA CUNHA SOUZA

Platonia insignis Mart.: ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E ANTIBACTERIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES OBTIDAS DA CASCA DO CAULE

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dra. Sabrina Maria Portela Carneiro
Universidade Federal do Piauí

Aos meus pais, Antônio José e Socorro, pelo amor e dedicação incondicionais.

E aos meus irmãos, Andréa e Lucas, pela amizade e cumplicidade.

Em seu coração
o homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor é quem determina
os seus passos.

Provérbios 16:9

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades que me proporciona, pela força para superar os desafios e por me cuidar e guardar sempre.

Aos meus pais, Antônio José e Socorro, pelo amor, compreensão e apoio incondicional.

Aos meus irmãos (Andréa e Lucas) e aos meus primos (Vanessa, Richardson e Lucas) pelo companheirismo e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, pela generosa orientação, pela acolhida, pelos conhecimentos compartilhados, apoio e por ser um exemplo de pessoa e profissional.

À Prof. Dra. Mariana Helena Chaves, do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, pelo fornecimento do material vegetal para realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia - BIOTEC, da Universidade Federal do Piauí, em especial ao Patrick Quelemes, Alyne Araújo, Leiz Veras e ao prof. Dr. José Roberto de Souza Almeida Leite pela parceria e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Atividade Anti-leishmania, Lucas Brito, Michel Muálem, Thaynara Parente, Camila Ernanda, Layane Valéria, Enoque Junior, Lourdes Cristina e Gabriele Mororó pela ajuda inestimável na construção desse trabalho.

À turma 2014 do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPI pela amizade e por dividirem todos momentos dessa etapa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFPI, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Amplamente distribuída em todo mundo, as leishmanioses afetam o homem e os animais, sendo no homem caracterizada por quatro formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral. A quimioterapia das leishmanioses tem sido baseada no uso dos antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, pentamidina e anfotericina B, são segunda escolha no tratamento, importantes na terapia de pacientes com coinfeções ou em casos de tratamento resistente aos antimoniais. O parasita apresenta potencial de desenvolver resistência ao tratamento farmacológico e o mesmo é limitado, caro, com administração parenteral dolorosa, de longa duração e alta toxicidade. Paralelamente a esse cenário temos, no campo da microbiologia, um aumento progressivo do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos por diversos patógenos. Esse fenômeno impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antileishmania e/ou antibacteriana e que tenham baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa para o tratamento de tais afecções. Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antileishmania e imunomoduladora do extrato etanólico (Ext-EtOH) e das frações hexânica (F-Hex), etérea (F-Eté) e acetato de etila (F-AcOEt) da casca do caule de *Platonia insignis* Mart. sobre *Leishmania amazonensis*, citotoxicidade sobre macrófagos e atividade bacteriostática e bactericida sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. O Ext-EtOH, F-Hex e F-Eté inibiu o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* gerando uma CI_{50} de 174,24; 45,23 e 53,68 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e sobre formas amastigotas CI_{50} de 40,58; 35,87 e 46,71 $\mu\text{g/mL}$, a F-AcOEt não obteve ação significativa contra ambas as formas do protozoário, com CI_{50} superior a 800,00 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CC_{50} para macrófagos ficaram em 341,95; 71,65; 232,29 e >800 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, superando os valores de CI_{50} para amastigotas. O Ext-EtOH, F-Hex e F-AcOEt, não estimularam a atividade lisossomal, fagocítica e não incrementaram a produção de óxido nítrico. A F-Eté, entretanto estimulou a atividade lisossomal e a capacidade fagocítica sem alterar a produção de óxido nítrico. Sobre bactérias, a única fração que mostrou efetividade foi a F-Hex, que apresentou ação bactericida como CBM de 50 $\mu\text{g/mL}$. Conclui-se que o Ext-EtOH, F-Hex e F-Eté apresentou atividade contra leishmania, com citotoxicidade aceitável para macrófagos murinos, podendo a F-Eté atuar através da ativação de macrófagos. Por sua vez, a F-Hex apresentou ação bactericida.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. *Platonia insignis* Mart. Citotoxicidade. Antileishmania. Antibacteriano.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic diseases caused by protozoan of the genus *Leishmania*. Widely distributed worldwide, leishmaniasis affect humans and animals, being the man characterized by four main clinical forms: cutaneous, mucocutaneous, diffuse and visceral. The chemotherapy of leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimony as first choice drugs, amphotericin B and pentamidine are the second one in the treatment, important in the therapy of patients with coinfections or in cases of treatment resistant antimony. Pharmacological treatment offers potential for developing resistance, are limited, expensive, painful with parenteral administration of long duration and high toxicity. Parallel to this scenario we have, in the field of microbiology, a progressive increase of antimicrobial resistance development by various pathogens. This phenomenon imposes severe limitations to the options for the treatment of bacterial infections, which represents a threat to public health. Substances obtained from species native to Brazil, which have antileishman activity and / or antibacterial and have low toxicity, may prove to be an alternative for the treatment of such diseases. Given the above this study aims to evaluate the *Leishmania* and immunomodulatory activity of the ethanol extract (Ext-EtOH), and hexane fractions (F-Hex), etheric (F-Eté) and ethyl acetate (F-ActOH) of *Platonia Insignis* Mart. On *Leishmania amazonensis* cytotoxicity on macrophages and bacteriostatic and bactericidal activity against gram-positive and gram-negative bacteria. An Ext-EtOH, F-Hex and F-Eté inhibited the growth of *L. amazonensis* promastigotes generating a CI_{50} of 174,24; 45,23 e 53,68 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and about amastigotes CI_{50} of 40,58; 35,87 e 46,71 $\mu\text{g/mL}$, a F-AcOEt obtained IC for amastigotes 1766,08 $\mu\text{g/mL}$ and showed no action on promastigotes The CC_{50} values were in macrophages 341,95; 71,65; 232,29 e >800 $\mu\text{g/mL}$, respectively, exceeding the CI_{50} values for amastigotes. The Ext-EtOH, F-Hex and F-AcOEt, not stimulated lysosomal activity, phagocytic and not increased nitric oxide production. The F-Eté, however stimulated lysosomal activity without, however, changing the nitric oxide production. On bacteria, the only fraction that showed effectiveness was the F-Hex, which showed bactericidal action as CBM 50 $\mu\text{g/mL}$. We concluded that the Ex-EtOH, F-Hex and F-Eté has activity against leishmania, with acceptable cytotoxicity to murine macrophages. F-Eté may act through activation of macrophages. The F-Hex showed bactericidal action.

Keyword: *Leishmania amazonensis*. *Platonia insignis* Mart. Cytotoxicity. Anti-Leishmania. Antibacterial.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo biológico do protozoário do gênero <i>Leishmania</i>	18
FIGURA 2	Formas Clínicas da Leishmaniose no homem.....	20
FIGURA 3	Distribuição geográfica e número de novos casos em 2012 da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	21
FIGURA 4	<i>Platonia insignis</i> Mart.	26
FIGURA 5	Procedimento de obtenção do Ext-EtOH e frações das cascas do caule da <i>P. insignis</i>	33
FIGURA 6	Efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	37
FIGURA 7	Micrografias da atividade antileishmania do Ext-EtOH, F-Hex, F-DCM, F-AcOEt, F-Aquo e Ac-B de <i>M. caesalpinifolia</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	43
FIGURA 8	Efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	39
FIGURA 9	Macrófagos infectados experimentalmente com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	40
FIGURA 10	Macrófagos infectados experimentalmente com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> não tratados e tratados com o Anfotericina, Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	41
FIGURA 11	Efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.....	43
FIGURA 12	Atividade lisossomal de macrófagos tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	45
FIGURA 13	Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	47
FIGURA 14	Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Concentração inibitória média (CI ₅₀) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	38
TABELA 2	Concentração inibitória média (CI ₅₀) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	40
TABELA 3	Concentração citotóxica média (CC ₅₀) sobre macrófagos murinos, concentração inibitória média (CI ₅₀) sobre formas amastigotas do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt em 48 h de exposição e respectivos índices de seletividade.....	43
TABELA 4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Anf-B – Anfotericina B
- CBM – Concentração bactericida mínima
- CC₅₀ – Concentração citotóxica média
- CI₅₀ – Concentração inibitória média
- CIM – Concentração inibitória mínima
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DTN – Doenças tropicais negligenciadas
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- Ext-EtOH - Extrato etanólico
- F-AcOEt – Fração acetato de etila
- F-Eté – Fração etérea
- F-Hex – Fração hexânica
- IFN- γ – Interferon gama
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-5 – Interleucina 5
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 – Interleucina 12
- iNOS – Óxido nítrico-sintase induzida
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina,
- MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio
- NO – Óxido nítrico
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PBS – Tampão fosfato-salino
- SFB – Soro fetal bovino
- TNF – Fator de necrose tumoral-alfa
- WHO – World Health Organization
- VRE – *Enterococos* resistentes à vancomicina
- VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 As leishmanioses.....	18
2.1.1 Epidemiologia.....	20
2.1.2 Resposta imune a leishmaniose	22
2.1.3 Controle e Tratamento da doença	23
2.2 Terapia antibacteriana e resistência	25
2.3 Plantas medicinais: Uma fonte de novos compostos com propriedades terapêuticas. ...	25
2.4 <i>Platonia insignis</i> Mart. como possível fonte de compostos terapêuticos.	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral:	30
3.2 Objetivos Específicos:	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Obtenção do extrato e das frações da casca do caule de <i>P. insignis</i> e preparo das amostras	32
4.2 Animais.....	33
4.3 Parasitos e Células	33
4.4 Medicamentos de referência	34
4.5 Atividade anti-leishmania sobre formas promastigotas do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	34
4.5.1 Micrografias da atividade antileishmania sobre formas promastigotas	35
4.6 Atividade anti-leishmania sobre formas amastigotas axênicas Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	35
4.7 Atividade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre infecção de macrófagos por <i>L. amazonensis</i>	36
4.8 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT	36
4.9 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pelo Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	37
4.9.1 Preparo de soluções.....	37
4.9.2 Avaliação da atividade lisossomal	37
4.9.3 Avaliação de determinação da capacidade fagocítica	38
4.9.4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico	38
4.10 Determinação da concentração inibitória mínima	38

4.11 Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Avaliação do efeito antileishmania do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	41
5.2 Avaliação do efeito antileishmania do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	43
5.3 Avaliação do efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> sobre a infecção de macrófagos por <i>L. amazonensis</i>	45
5.4 Avaliação da citotoxicidade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i> frente a macrófagos peritoneais murinos.	47
5.5 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pelo Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de <i>P. insignis</i>	49
5.5.1 Atividade Lisossomal.....	49
5.5.2 Determinação da capacidade fagocítica	50
5.5.3 Produção de Oxido Nítrico.....	51
5.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt em µg/mL de <i>P. insignis</i> sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.	52
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

Introdução



1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Amplamente distribuída em todo mundo, essa patologia ocorre na Ásia, Europa, África e Américas, sendo que existem relatos sobre a doença, no continente americano, desde a época colonial (RATH et al., 2003; WHO, 2014). As leishmanioses, são capazes de afetar o homem e os animais, acometendo mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 2 a 3 milhões de novos casos a cada ano (SILVA, 2004; CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em áreas de contaminação de leishmaniose (OMS, 2007). Os humanos são infectados pela picada de flebotomíneos, inseto vetor, que vive em áreas florestais, cavernas ou em tocas de roedores. De acordo com indicadores do Data SUS, no Brasil do ano de 2005 a 2014 foram confirmados 217.462 casos de leishmaniose tegumentar americana, só no ano de 2014 foram notificados 20.296 casos, a região nordeste notificou nesse mesmo ano 4.969 casos (Data SUS, 2016).

Historicamente, a quimioterapia das leishmanioses tem sido baseada no uso dos antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, como o estilbogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) (BRENDLE et al., 2002). Os fármacos de segunda escolha como a Pentamidina e Anfotericina B, são importantes na terapia de pacientes com coinfeções, ou em casos de tratamento resistente aos antimoniais (SUNDAR et al., 2010; SUNDAR et al., 2015). No entanto esses medicamentos necessitam de administração parenteral, o tratamento é longo, os efeitos secundários são graves além das altas taxas de recaída, em especial, nos pacientes imunocomprometidos (KAYSER, KIDERLEN, CROFT, 2003; CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006; BHATTACHARY et al., 2007; SUNDAR et al., 2010). Devido a essas dificuldades torna-se importante a busca por novos agentes quimioterápicos que sejam mais seguros e eficazes contra leishmaniose.

Paralelamente a esse cenário temos, no campo da microbiologia, um aumento progressivo do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos por diversos patógenos (COSTA et al., 2008). Ocasionalmente principalmente pela disseminação do uso de antibióticos, que lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas contra os agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência. O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde

pública. Esta resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias Gram-positivas, como enterococos, estafilococos, estreptococos, tornando-se de grande importância a pesquisa de novos agentes para o combate de infecções (SILVEIRA et al, 2006)

Substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antileishmania e/ou antibacteriana e que tenham baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa para o tratamento de tais afecções. As plantas produzem substâncias para sua própria defesa em resposta a um ataque patogênico, muitas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis com a finalidade de defesa e atrair seus polinizadores (COSTA et al., 2005).

Nesse contexto, o uso de espécies vegetais é uma alternativa bastante promissora, sua importância evidencia-se pela ampla química dos diversos metabólitos produzidos por essas espécies, com natureza química, física e biológica diferenciada, possivelmente ativos contra bactérias e/ou leishmania (COSTA et al., 2008).

Platonia insignis Mart. é uma espécie vegetal bastante promissora contra a leishmaniose. Do extrato hexânico obtido das sementes dessa espécie obtém-se uma substância isolada denominada Garcinielliptona, a qual apresentou expressiva atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (COSTA JÚNIOR et al., 2013a). Esse extrato hexânico tem ação imunomoduladora *in vitro* comprovada, com aumento do volume lisossomal e da capacidade de fagocitose de macrófagos murinos, assim como estimulação da produção de óxido nítrico por essas células (LUSTOSA et al., 2016).

Considerando-se que não há estudos sobre o potencial antileishmania e antibacteriano de extratos e frações obtidos da casca do caule de *P. insignis* e que estudos sobre a atividade antileishmania e antibacteriana de plantas medicinais apresentam um grande desafio para a descoberta e identificação de novas substâncias ativas, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da atividade antileishmania, antibacteriana e a citotoxicidade de extrato e frações obtidos a partir da casca do caule dessa espécie.

Revisão de Literatura

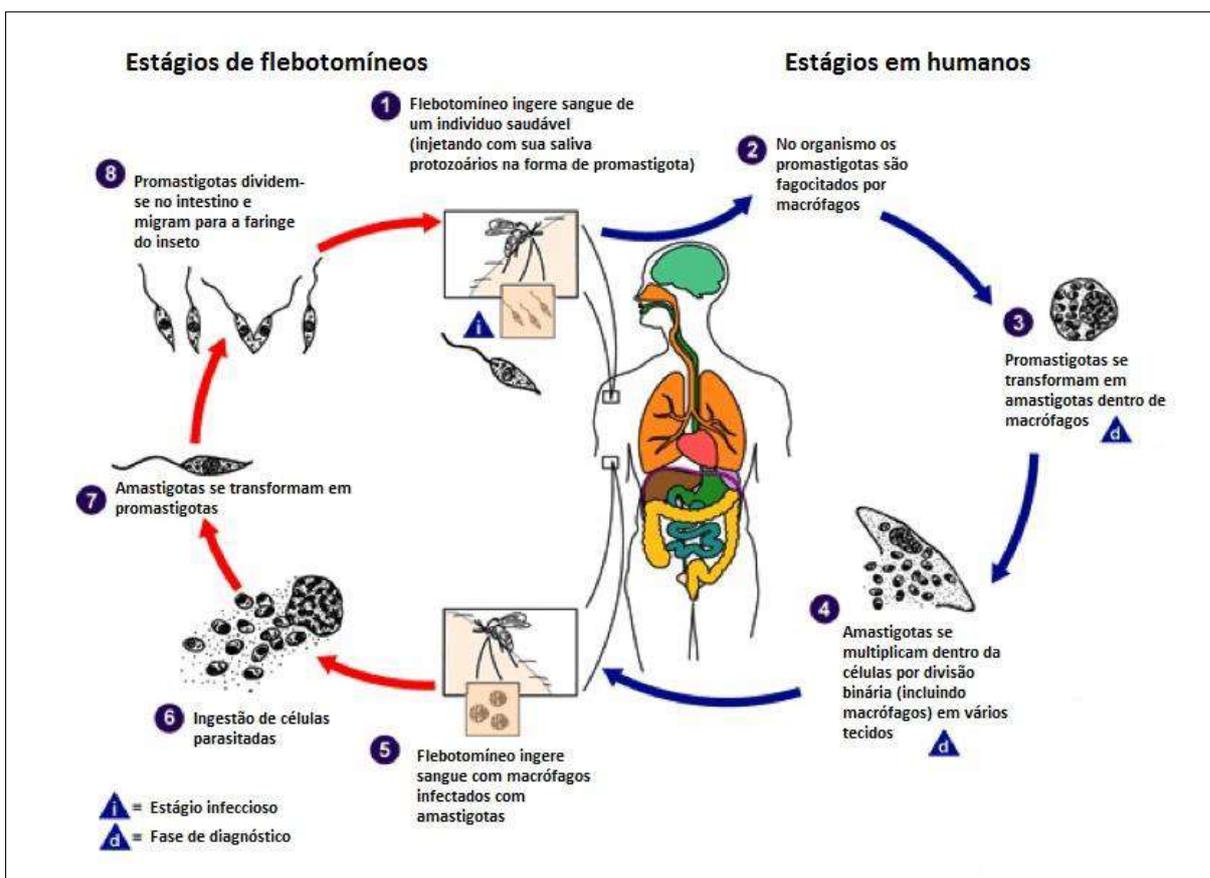


2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No ciclo de vida das leishmanias, estas passam por duas formas variáveis, a de promastigota e amastigota. As promastigotas são alongadas e flageladas encontradas no trato digestivo do inseto vetor, da subfamília Phlebotominae. Já a forma amastigota é um parasito intracelular obrigatório, que infecta células do sistema monocítico fagocitário de vertebrados, e apresenta-se com flagelo interno (VAN ZANDBERGEN et al., 2006; BANULS, HIDE e PRUGNOLLE, 2007).

Figura 1 – Ciclo biológico do protozoário do gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

A transmissão do parasito para vertebrados se dá pela picada de fêmeas do inseto vetor, que vive em áreas florestais, cavernas ou em tocas de roedores, pertencente à ordem Diptera é

comumente chamado de flebótomo. As principais espécies encontradas no Brasil são *Lutzomyia longipalpis*, *L. flaviscutellata*, *L. wellcomei*, *L. pessoai*, *L. umbratilis*, *L. anduzei* e *L. whitmani* (KATO et al., 2010).

Após a picada do inseto vetor as formas promastigotas encontradas no seu trato digestivo são regurgitadas, infiltram-se na pele e a partir daí são capturadas pelas células do sistema fagocítico residentes ou que se infiltram na pele, ligam-se a receptores de macrófagos hospedeiros, desencadeando fagocitose e subsequente internalização, um passo crucial para a sua sobrevivência. Parasitas fagocitados transformam-se intracelularmente em formas amastigotas (Figura 1). A maioria dos parasitas residem no interior de macrófagos de tecidos diferentes durante as diferentes formas clínicas da leishmaniose e podem ser mortos no meio intracelular através da ativação de macrófagos. No entanto, alguns parasitas sobrevivem e multiplicam-se dentro dessa célula hospedeira, assim ao fazer o repasto sanguíneo o flebotomíneo ingere formas amastigotas ou células parasitadas, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo, multiplicam-se e migram para a probóscida onde são regurgitados após um novo repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo (HSIAO et al., 2011; UENO e WILSON, 2012).

A leishmaniose no homem é caracterizada por quatro formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral (Figura 2). A forma clínica mais comum da doença, cutânea localizada, causa uma lesão na pele que pode curar espontaneamente, após algumas semanas ou meses, mas pode deixar marcas permanentes. A forma mucocutânea inicia-se com úlceras simples de pele, as quais podem produzir metástases na região oronasal, causando destruição tecidual, em alguns casos extremamente mutilantes. A forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas, as quais se assemelham às da hanseníase e são mais difíceis de curar. Estas lesões múltiplas contêm alto número de parasitos e são causadas pela *Leishmania amazonensis*, no Brasil; A forma visceral da doença é a mais grave e está associada com a infecção generalizada e alta mortalidade (MURRAY et al., 2005; PINHEIRO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015).

Figura 2 – Formas Clínicas da Leishmaniose no homem.



Legenda: A: forma cutânea; B: forma mucocutânea; C: forma difusa; D: forma visceral. Adaptado de BRASIL, 2013.

2.1.1 Epidemiologia

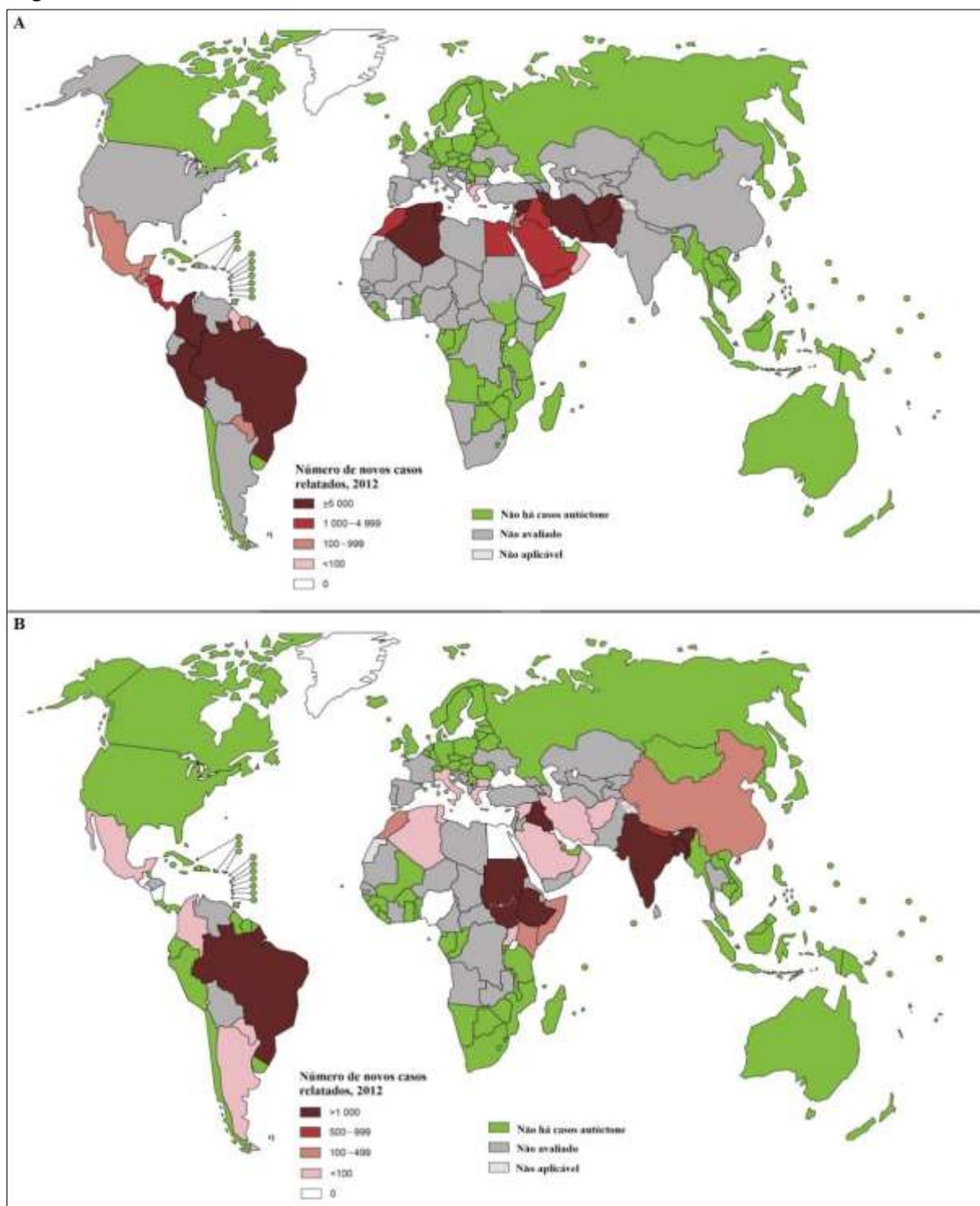
A Leishmaniose é uma doença endêmica em 88 países, principalmente os em desenvolvimento (Afeganistão, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Índia, Irã, Nepal, Peru, Arábia Saudita, Sudão, Síria). O Brasil tem uma importante situação epidemiológica, onde todos os tipos de leishmaniose foram relatados (SIQUEIRA et al., 2010).

Essa doença está incluída no grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTN), provocando altos índices de mortalidade e de morbidade. DTN são infecções crônicas endêmicas na população de baixa renda ou cujas condições socioeconômicas são desfavoráveis (FEASEY et al., 2010; WHO, 2010).

As formas tegumentares são causadas principalmente por *Leishmania major* e *L. tropica* no Velho Mundo e por membros *L. mexicana* e *L. braziliensis* no Novo Mundo. No Brasil, a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e a *L. guyanensis* são as principais causadoras das formas tegumentares da doença (PINHEIRO et al., 2013). Amplamente distribuída em todo mundo, as

leishmanioses afetam o homem e os animais. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (RATH et al., 2003; WHO, 2014)

Figura 3 - Distribuição geográfica e número de novos casos em 2012 da Leishmaniose Tegumentar Americana.



Legenda: A: Leishmaniose tegumentar; B: Leishmaniose visceral.

No contexto da saúde pública, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem aumentado significativamente sua importância devido ao crescente processo de urbanização. Inicialmente, a doença tinha caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte. Em franca expansão geográfica no Brasil, a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma das infecções dermatológicas mais importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar (DIAS et al., 2007).

O perfil epidemiológico da doença tem sofrido alterações e o contato entre o homem e o parasito foi favorecido pelo desenvolvimento urbano, devastação de florestas, mudanças ambientais, e migração para as áreas endêmicas, aumentando o número de casos em regiões urbanas e periurbanas (ASHFORD, 2000; NEITZKE et al., 2008; TARIKU et al., 2010).

Essas doenças afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 2 a 3 milhões de novos casos a cada ano (SILVA, 2004; CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006). Segundo a OMS, aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em áreas de contaminação de leishmaniose (OMS, 2007). No Brasil do ano de 2005 a 2014 foram confirmados 217.462 casos de leishmaniose tegumentar americana, só no ano de 2014 foram notificados 20.296 casos, a região nordeste notificou nesse mesmo ano 4.969 casos, e o Piauí 85 novos casos (Data SUS, 2016).

2.1.2 Resposta imune a leishmaniose

O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra leishmaniose depende de uma rede de cooperação envolvendo a participação de componentes estruturais, moleculares e celulares e a ação coordenada de células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativa (células T). A primeira barreira contra a infecção é a imunidade inata que é ativada pela fagocitose dos parasitos pelos macrófagos do hospedeiro, essa ação pode direcionar a resposta imune local gerando diferentes formas clínicas da doença. A resposta à infecção parece ser um processo dependente do genótipo e susceptibilidade do hospedeiro (SILVA-ALMEIDA et al., 2010) e da espécie de *Leishmania* (COÊLHO et al., 2010).

Uma vez dentro dos macrófagos os antígenos são processados e apresentados às células T, isso gera uma resposta do tipo Th1 ou Th2 (HERNÁNDEZ-CHINEA, 2007). Essas duas subpopulações são funcionalmente diferentes no que se refere à secreção de citocinas e estão diretamente correlacionadas com a resistência ou a susceptibilidade à infecção por leishmania:

o subtipo Th1, secreta principalmente interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ); e o subtipo Th2, secreta interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10) (WILSON et al., 2005).

Um perfil de citocinas tipo Th1, como IL-2, IFN- γ , IL-12, estará presente em quantidades suficientes para regular a resposta imunológica, ativar os macrófagos e controlar a infecção ainda na pele (WANDERLEY et al., 2012). Todavia, se quantidades excessivas de citocinas tipo Th2 são produzidas, tais como IL-4, IL-5 e IL-10, haverá uma menor ativação macrofágica e conseqüentemente aparecerão as formas clínicas da doença (ALEXANDER; MCFARLANE, 2008). A predominância da resposta Th1 na infecção favorece uma doença limitada, enquanto a resposta Th2 a disseminação da doença. Portanto, o evento crucial para indução da resposta imune protetora contra a leishmania é a eficiente ativação dessas células que estimula a liberação de outras citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), 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 e RÖLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2007).

Além da apresentação de antígeno os macrófagos são as células efetoras na morte de patógenos. Porém, sabe-se que as leishmanias são dotadas de mecanismos que lhes permitem escapar dessas defesas. Sendo um destes, a expressão de receptores de membrana do parasito, as quais impedem a formação do complexo lítico de ataque a sua membrana pelo sistema complemento do hospedeiro. Também são capazes de facilitar a fagocitose e ativar citocinas anti-inflamatórias, inibindo assim a produção de óxido nítrico (NO). Outro mecanismo de escape consiste na baixa regulação dos sinais que desencadeiam a resposta antiparasitária, havendo uma menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos macrófagos, caso contrário, o poder oxidante desses radicais livres atuariam na destruição dos parasitos. (CASTELLANO, 2005; DEOLINDO, 2008). Essas alterações são benéficas para a sobrevivência do parasito no interior de macrófagos, garantindo a continuidade da infecção. Dessa forma, a leishmania é capaz de subverter a resposta imune, escapando dos mecanismos microbicidas do macrófago.

2.1.3 Controle e Tratamento da doença

O controle das leishmanioses é feito através do combate ao inseto vetor, detecção dos reservatórios e tratamento dos casos humanos (SANTIAGO et al., 2008).

Devido à falta de uma vacina humana confiável, e ao difícil controle de vetores de parasitas e reservatórios, o tratamento baseia-se exclusivamente na quimioterapia, com antimoniais pentavalentes, como drogas de primeira linha (PARRA et al., 2010).

Os antimoniais são representados por estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) (BRENDLE et al., 2002). Os fármacos de segunda escolha como a Pentamidina e Anfotericina B, são importantes na terapia combinada, ou em casos de tratamento resistente aos antimoniais (SUNDAR et al., 2006; SUNDAR et al., 2015).

Os antimoniais pentavalentes, são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de leishmania. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, são inibidos. Os compostos de antimônio pentavalente, como o estibogluconato de sódio, exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas que crescem em culturas de tecidos. Essa droga não é metabolizada de modo apreciável, mais de 12% da dose do antimônio fica retido, tendo uma meia vida de $32,8h \pm 3,8h$. Essa retenção nos tecidos é responsável pelos efeitos tóxicos. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, inicia-se novo tratamento com as drogas de segunda escolha, anfotericina B e as pentamidinas (BRASIL, 2013).

O desoxicolato de Anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de leishmania intra e extracelular. É considerada como droga de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. É uma droga leishmanicida, atuando nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo* de leishmania. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática do parasito (BRASIL, 2013; DUTTA ET AL., 2005).

As pentamidinas são diamidinas aromáticas que também vem sendo utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano (SUNDAR et al., 2015; BRASIL, 2013)

Na última década, a falta de responsividade para antimoniais, a primeira linha de tratamento, aumentou substancialmente, principalmente em áreas endêmicas, como a Índia (CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006; NATERA et al., 2007). A anfotericina B, pentamidina e miltefosina têm sido utilizados como medicamentos alternativos. Atualmente os tratamentos, além do potencial de desenvolver resistência, são limitados, caros, com administração parenteral dolorosa, de longa duração e alta toxicidade (LEANDRO; CAMPINO, 2003; KAYSER, KIDERLEN, CROFT, 2003; CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006; CHAPPUIS et

al., 2007; BHATTACHARYA et al., 2007; SUNDAR et al., 2010; LINDOSO et al., 2012; SUNDAR et al., 2015).

As dificuldades no tratamento da LTA, como surgimento de resistência aos medicamentos, ausência de preparações por via oral, etc. incentiva a inovação no desenvolvimento de novos medicamentos contra a leishmaniose. Nesse campo muitas pesquisas têm sido feitas, a fim de encontrar novos compostos da biodiversidade com potencial atividade leishmanicida (SIQUEIRA et al., 2010).

2.2 Terapia antibacteriana e resistência

O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas (SILVEIRA, et al., 2006). A evolução na quimioterapia antimicrobiana teve início na década de 30 com a descoberta das sulfonamidas e as penicilinas. Porém nas subseqüentes décadas de 50 e 70, epidemias por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina e linhagens multiresistentes (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, MRSA), chamaram a atenção para o problema da resistência adquirida aos antimicrobianos. Atualmente, MRSA é o maior patógeno nosocomial em infecções hospitalares e é responsável por inativar a ação de vários antibióticos, tornando a multiresistência, um grande problema de saúde pública (STRATTON, 2000; SILVA et al., 2007).

Em razão ao grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas (NOVAIS et al., 2003; ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

2.3 Plantas medicinais: Uma fonte de novos compostos com propriedades terapêuticas.

Nesse contexto, a procura por novos compostos com ação antileishmania e/ou antibacteriana, nos direciona em busca de conhecimento sobre princípios ativos de plantas. O Brasil é um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos (CALIXTO, 2000; RATES, 2001).

Vários estudos tem sido realizados utilizando produtos naturais como fonte de espécies ativas que podem vir a ser utilizadas no tratamento de doenças, principalmente de origem vegetal (SIQUEIRA et al., 2010). Várias estratégias têm sido empregadas para a obtenção de novos compostos eficazes contra a *Leishmania spp* e um certo número de produtos naturais com diversas classes estruturais mostraram propriedades antileishmania, demonstrando que os referidos produtos podem ser promissores para o desenvolvimento de novas drogas (RODRIGUES et al., 2015).

Estudos realizados por Carneiro e colaboradores (2012), utilizando extratos e frações das folhas e das cascas do fruto de *Azadirachta indica* sobre *L. amazonensis*, revelou potente atividade antileishmania com CI_{50} de 1,1 $\mu\text{g/mL}$ contra formas promastigotas e 0,4 $\mu\text{g/mL}$ contra formas amastigotas e baixa citotoxicidade contra células de mamíferos. Outra pesquisa realizada com o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* por Rodrigues e colaboradores (2013) revelou outra potente substância que teve como CI_{50} em promastigotas 1,75 $\mu\text{g/mL}$ e 1,92 $\mu\text{g/mL}$ em amastigotas. Em 2015, Araújo e colaboradores mostraram que o extrato etanólico e frações de *Terminalia fagifolia* Mart. exibiu grande atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* com concentração inibitória mínima (CIM) de 25 $\mu\text{g/mL}$. Estas pesquisas demonstram e firmam que produtos naturais de origem vegetal são fontes esperanças de compostos com atividade antileishmania e antibacteriana.

A busca de novos agentes quimioterápicos é, portanto, um foco de investigação para tratamento de doenças. A utilização de produtos naturais no tratamento de uma variedade de doenças, também aumentou devido ao número considerável de plantas medicinais com comprovada atividade biológica aplicável ao tratamento de algumas doenças (GUIMARÃES et al., 2010).

A pesquisa para medicamentos novos, mais eficazes e menos tóxicos é necessária para o tratamento destas patologias, bem como na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. (ROCHA et al., 2009).

As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obtenção de moléculas protótipos, devido a sua diversidade de seus constituintes (NASCIMENTO, LOCATELLI e FREITAS, 2000; PESSINI et al., 2003; DUARTE et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006).

2.4 *Platonia insignis* Mart. como possível fonte de compostos terapêuticos.

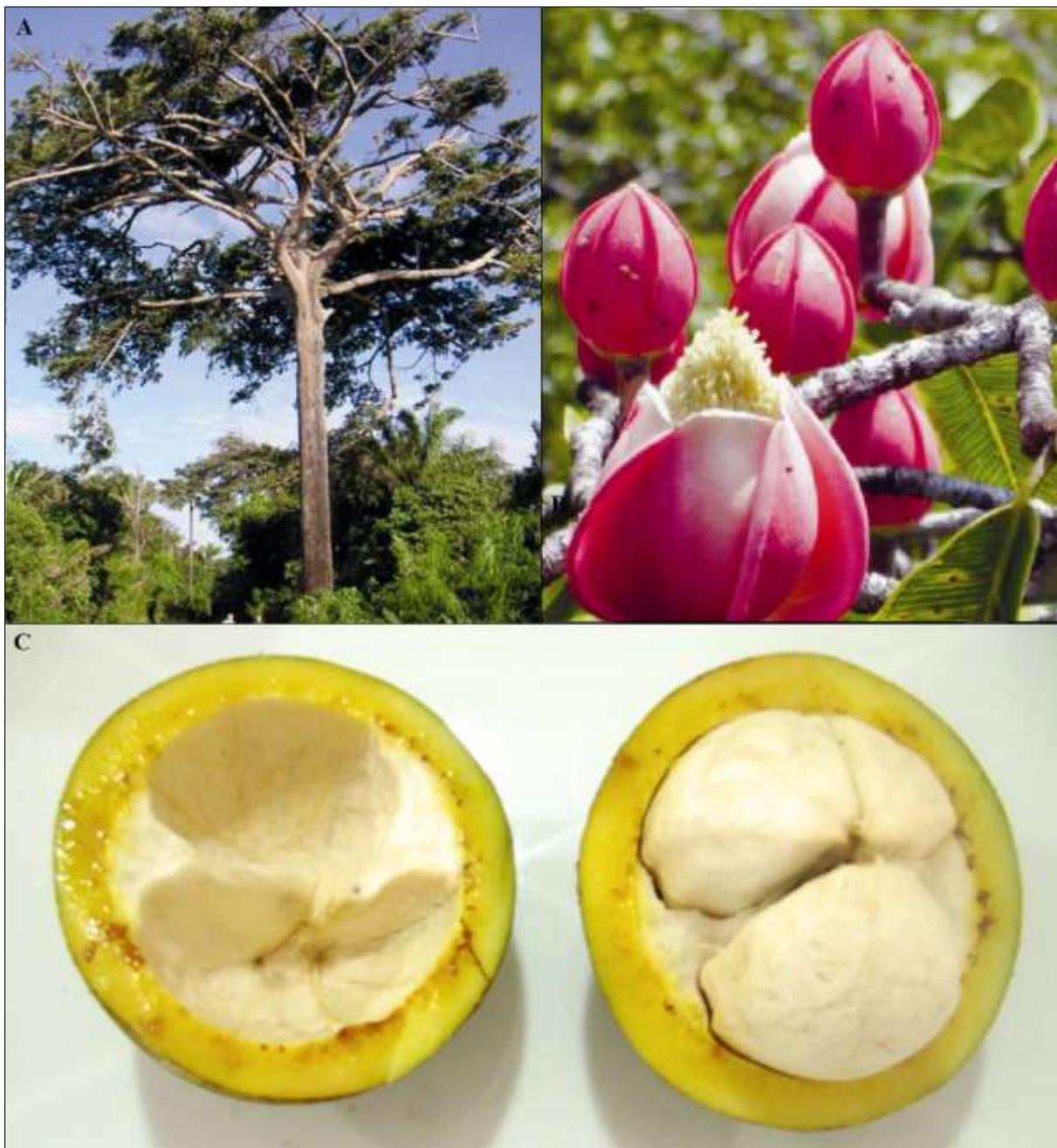
Em estudo prévio de prospecção realizado no Laboratório de Atividade Anti-leishmania no Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI), foram testados vários extratos e frações de plantas oriundas do cerrado piauiense. Nesse estudo foram avaliadas o potencial anti-leishmania e citotóxico dos extratos etanólico e aquoso e da fração hexânica de *Bauhinia pulchella* e *Senna acuruensis*, assim como o extrato etanólico e a fração hexânica da casca do caule de *P. insignis* e o extrato etanólico dos galhos de *Oxandra sessiliflora* e das folhas de *Ephedranthus pisocarpus*. Entre as amostras analisadas, as que obtiveram melhores resultados foram as do extrato etanólico (Ext-EtOH) e a fração hexânica (F-Hex) da casca do caule de *P. insignis*. Partindo desses resultados decidiu-se ampliar o estudo acerca desse extrato e fração, incluindo-se ainda neste trabalho as frações acetato de etila (F-AcOEt) e etérea (F-Eté).

P. insignis é uma planta frutífera e madeireira com população densa e diversificada, ocorrendo da Amazônia ao Piauí. Pertence à família Clusiaceae e é popularmente conhecida como “bacurizeiro” (FERREIRA, 2008). A família Clusiaceae é composta por 1000 espécies e 47 gêneros, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. É também um gênero encontrado em regiões temperadas (AGUIAR et al., 2008).

A espécie *P. insignis* é popular por causa da polpa cremosa que envolve a semente e que possui um distinto, forte, ácido, doce e agradável sabor. O fruto é obtido da mata selvagem ou de árvores cultivadas em fazendas (CLEMENTE; VENTURIERI, 1990). A árvore do bacuri pode atingir 20 metros ou mais e 50 a 120 cm de diâmetro. O fruto é ovóide com 7 a 15 cm de comprimento, pesando entre 200 a 1000g. A casca é grossa (1-3 cm), com coloração de amarelo pálido a acastanhado, resistente e pouco elástico, e quando machucado libera um látex amarelo (CALZAVARA, 1970; FOUQUÉ, 1974).

No Brasil seu uso popular é resultado das suas diversas propriedades, tais como, cicatrizante, antimicrobiana, digestiva, diurética, antitumoral, citotóxica e antioxidante (SOUZA, 2009; SANTOS JUNIOR et al., 2010).

Figura 4 – *Platonia insignis* Mart.



P. insignis: (A) Árvore; (B) Flores; (C) Fruto. Fonte: Santos, et al., 2013.

Objetivos



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar a atividade antileishmania e imunomoduladora do extrato etanólico (Ext-EtOH) e das frações hexânica (F-Hex), etérea (F-Eté) e acetato de etila (F-AcOEt) de *Platonia insignis* Mart. sobre *Leishmania amazonensis*, citotoxicidade sobre macrófagos e atividade bacteriostática e bactericida sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar a atividade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*;
- Investigar a ação do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas em macrófagos;
- Avaliar o potencial citotóxico do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre macrófagos peritoneais murinos;
- Investigar a atividade lisossomal de macrófagos pré-tratados com o Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*;
- Verificar os efeitos do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre a atividade fagocítica de macrófagos;
- Verificar os efeitos sobre a síntese de óxido nítrico por macrófagos tratados com o Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Materiais e Métodos

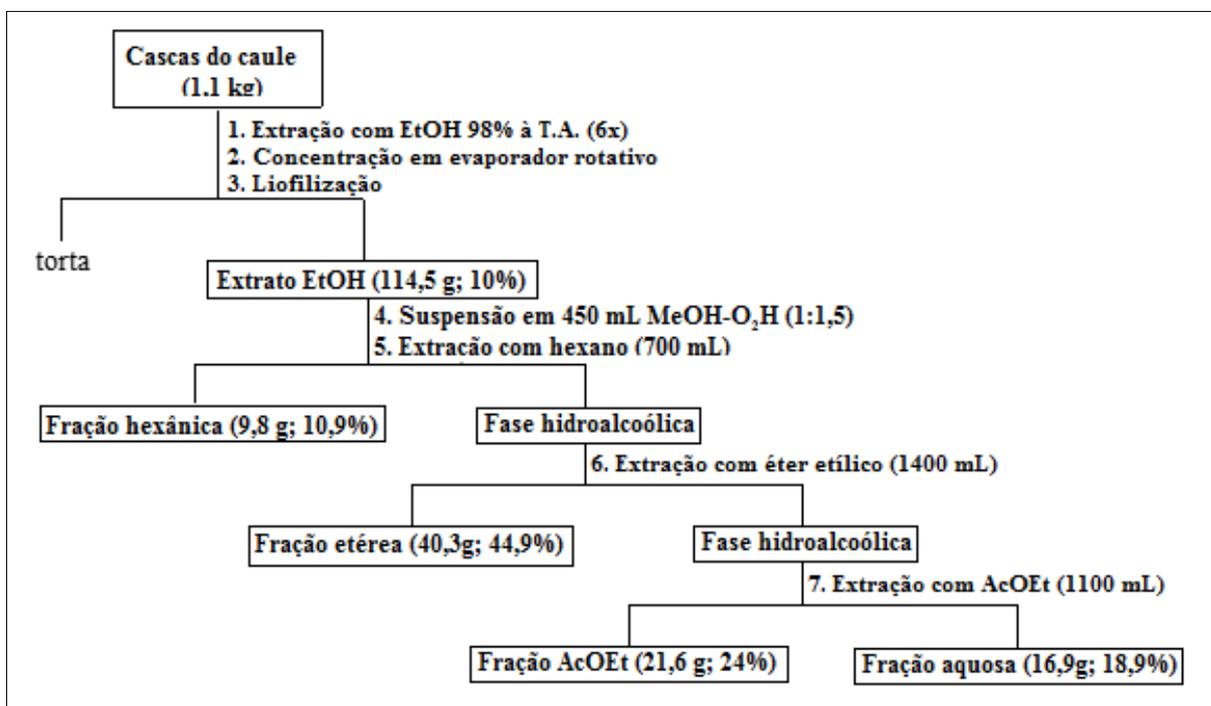


4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato e das frações da casca do caule de *P. insignis* e preparo das amostras

As cascas do caule de *P. insignis* foram coletadas em setembro de 2010, no município de Timon-MA. A exsiccata da espécie encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, como o número TEPB 20701. As cascas do caule de *P. insignis* foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas. O material (1,1 kg) foi submetido a maceração com etanol por seis vezes, consecutivas e tendo a duração de cinco dias cada extração. Após remoção do solvente em evaporador rotativo, seguido de liofilização foi obtido 114,5 g de extrato etanólico. Uma alíquota de 90 g do extrato EtOH foi suspensa em MeOH-H₂O (2:3) e em seguida submetida a partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano, éter etílico e acetato de etila (AcOEt) sucessivamente, obtendo-se as frações correspondentes a cada solvente (Figura 5).

Figura 5 – Procedimento de obtenção do Ext-EtOH e frações das cascas do caule da *P. insignis*.



(Fonte: Arquivo pessoal)

O Ext-EtOH, F-AcOEt, F-Eté e F-Hex da casca do caule de *P. insignis* foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a. Mariana Helena Chaves, Laboratório de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí (LPN-CCN-UFPI).

O Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e a F-AcOEt foram solubilizados em DMSO a fim de se obter uma solução-mãe de 80 mg/mL. Em cada protocolo, a solução-mãe foi diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,2% de DMSO.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c (20-30g), machos e fêmeas de 4-5 semanas de vida, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais NPPM-UFPI, mantidos a 25 ± 1 °C e ciclo claro escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após tranquilização e sedação por injeção intraperitoneal de uma associação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso vivo) de acordo com a RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 12 DE MAIO DE 2012, CRMV (Conselho Regional de Medicina Veterinária), sendo as eutanásias realizadas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, CFMV-PI Nº 0335.

4.3 Parasitos e Células

Foram utilizadas cepas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), mantidas no Laboratório de Atividade Antileishmania, Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, em passagens sucessivas em Camundongos BALB/c e cultivados em meios Schneider's (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 26 °C.

Os macrófagos utilizados neste trabalho foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c de 4 a 5 semanas de vida, anteriormente mantidos em álcool 70% após a eutanásia. A retirada dos macrófagos foi feita em capela de fluxo laminar onde o animal, após eutanásia, foi fixado em placa na posição de decúbito dorsal, administrando-se 8 mL de tampão fosfato salino (PBS – NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,4), estéril, a 4 °C, na cavidade abdominal. Em seguida foi feita uma massagem suave na região abdominal e realizada a aspiração do PBS injetado utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo cônico de poliestireno com capacidade de 50 mL, centrifugado a 1000 rpm durante 10 min. Logo após foi lavado com PBS estéril na

temperatura de 4 °C. Para averiguação da viabilidade celular, foram contados em Câmara de Neubauer diluído em corante azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Todos os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, protocolo nº 014/15.

4.4 Medicamentos de referência

Anforicina B[®] (Cristália, São Paulo, Brasil), foi utilizada como controle positivo nos protocolos de atividade antileishmania. Anforicin B[®] foi solubilizado previamente em DMSO atingindo a concentração de 80 mg mL e posteriormente diluídos nos meios de cultura. Foram utilizadas concentrações 10 a 0,039 µg mL para Anforicina B[®].

4.5 Atividade anti-leishmania sobre formas promastigotas do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento. Os parasitos foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 leishmania/100 µL de meio. Em seguida, Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté, F- AcOEt foram adicionados aos poços em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo oito faixas de concentrações finais desejadas (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µg mL). A placa foi incubada em estufa demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26 °C por 48 h e, restando 6 h para o término deste período, foram adicionados 20 µL de resazurina 1×10^{-3} mol L⁻¹, quando incubou-se novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorvância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de promastigotas mortas (%).

O controle positivo foi realizado com 2 µg mL de anfotericina B (Anf-B) diluído em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço. Já o controle negativo equivaleu ao meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço e, neste caso, a viabilidade foi de 100% para o parasito. A leitura do branco, para cada concentração e para os controles, fez-se necessária para desprezar a absorvância resultante do próprio meio com interferência ou não dos compostos estudados (Adaptado de NASIRY et al., 2007).

4.5.1 Micrografias da atividade antileishmania sobre formas promastigotas

Micrografias foram obtidas a partir de esfregaços espessos feitos em lâminas após 48 h de ação do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté, F-AcOEt sobre promastigotas de *L. amazonensis*, conforme protocolo 4.5. Para tal, utilizou-se somente o valor da CI_{50} de cada amostra.

As lâminas foram sensibilizadas com alíquotas de 10 μ L em cada orifício de formas promastigotas de *L. amazonensis*, utilizadas como antígeno, após a centrifugação de 100 μ L de cada substância por poço, seguido do descarte do sobrenadante. Deixou-se secar, de um dia para o outro, em estufa a 27 °C para uma boa fixação dos parasitos. A seguir, com objetivo de avaliar possíveis alterações morfológicas nas formas promastigotas realizou-se a imunofluorescência indireta (RIFI), Bio-Manguinhos®/FIOCRUZ, seguindo as orientações do fabricante.

4.6 Atividade anti-leishmania sobre formas amastigotas axênicas Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas até a fase exponencial tardia ou fase estacionária de crescimento foram lavadas uma vez em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, a concentração foi ajustada para 50×10^6 promastigotas por mL em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF), pH 5,5 ou 6,3 em frasco de cultivo celular 25cm² e mantidos a 34 °C sem CO₂. Após 5 dias as culturas foram repicadas. Sempre que necessário, os parasitos foram passados 3 vezes por agulha 26 G $\frac{1}{2}$ para desagregação dos grumos de amastigotas axênicos formados.

As formas amastigotas axênicas foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^7 amastigotas/100 μ L de em meio definido para sua manutenção, e incubadas por 48 horas a 34 °C e 5% de CO₂, na presença de diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 μ g mL) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt a serem testados. A atividade leishmanicida de cada composto foi avaliada através do método colorimétrico da resazurina. Após a incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C por 48 h, foram adicionados 20 μ L de resazurina 1×10^{-3} mol/L, faltando 6 h para o fim do protocolo. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorbância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de amastigotas mortas (%).

O controle positivo foi realizado com 2 μ g mL de anfotericina B diluído em meio Schneider's contendo 1×10^7 amastigotas por poço. Já o controle negativo equivaleu ao meio

Schneider's a 0,2% de DMSO contendo 1×10^7 amastigotas por poço, considerando 100% de viabilidade para o parasito. Fez-se necessário a leitura do branco para cada concentração e para os controles, ignorando a absorbância interferente do próprio meio na presença ou ausência dos compostos estudados (Adaptado de NASIRY et al., 2007).

4.7 Atividade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre infecção de macrófagos por *L. amazonensis*.

As promastigotas metacíclicas foram colocados em contato com os macrófagos na proporção de 10:1, respectivamente, na concentração de 2×10^6 de parasitos para 2×10^5 de células em 500 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF em tubo cônico de 50 mL. Os parasitos e células foram então incubados a 26 °C sem CO₂ por 1 hora sob agitação suave com intervalo de 10 min, a fim de permitir a interação e infecção. Finalizando este período, foi adicionado a placa de cultura com 24 poços, contendo lamínulas estéreis redondas de 13mm, 500 mL da suspensão celular e incubada por 5h a 37 °C e 5% de CO₂ a fim de permitir a adesão das células ao fundo da placa. Após 5 h de incubação, o meio foi aspirado para remover as promastigotas livres e células não fixadas e 500 mL de RPMI-1640 suplementado foi adicionado em cada poço contendo as soluções do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt na concentração correspondente a CI₅₀ de cada amostra.

Após incubação de 48 h, as lamínulas foram removidas, fixadas em metanol e coradas com Panótico rápido. Para cada lamínula, 100 células foram avaliadas e o número de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófagos foram contados. Estes valores foram então multiplicados para o cálculo do índice de infecção, necessário para se determinar a concentração inibitória para 50% das amastigotas internalizadas (CI₅₀). O controle negativo foi realizado com meio RPMI-1640 a 0,2% de DMSO, já o controle positivo continha presente o valor correspondente a CI₅₀ da Anf-B diluída em meio RPMI-1640 (CARNEIRO et al., 2012).

4.8 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT

Avaliou-se a citotoxicidade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* utilizando o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado e cerca de 2×10^5 macrófagos por poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI suplementado para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram

adicionados 100 μ L de RPMI 1640 suplementado juntamente com as soluções do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* diluídas nas concentrações 800 a 6,25 μ g/mL. Em seguida foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação, foi adicionado 10 μ L de MTT diluído em PBS a 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μ L de DMSO em todos os poços. Em seguida, a placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800). Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC₅₀) sendo o grupo controle considerado como 100% (NOGUEIRA et al., 2007). O controle negativo foi realizado com meio RPMI 1640.

A seguir, calculou-se o índice de seletividade para avaliar o nível de segurança do extrato e das frações frente a macrófagos murinos, esse índice representa a relação entre CC₅₀ e CI₅₀ para formas amastigotas (ÓSORIO, 2007).

4.9 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pelo Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.

4.9.1 Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada nos itens 4.9.2 e 4.9.3 constituiu-se de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador utilizado é o de 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 (GRANDO et al., 2009).

4.9.2 Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com o Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* nas concentrações de 800 a 3.125 μ g/mL. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 μ L de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-se por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os

poços foram lavados 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 30 min em agitador de Kline a placa foi lida a 550 nm (Bonatto et al., 2004).

4.9.3 Avaliação de determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com o Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* nas concentrações de 800 a 3.12 µg/mL. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 min a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker para paralisar o processo de fagocitose e, 30 min depois, 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, e adicionou-se 100 µL de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline as absorbâncias foram medidas a 550 nm (Grando et al., 2009).

4.9.4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 macrófagos por poço e incubados com o Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* nas concentrações de 800 a 3.125 µg/mL. Transcorrido 24 h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, transferiu-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. 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 RPMI 1640. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras (sobrenadantes) 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 fez-se a leitura das absorbâncias na leitora de placa a 550nm (SOARES et al., 2007).

4.10 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através da microdiluição estéreis em placa com 96 poços de fundo chato, sendo realizada uma diluição seriada de razão 2 com as concentrações do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* variando de 3,12 a 100 µL e caldo Mueller-Hinton com inoculo de 5×10^5 das bactérias. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C em condições aeróbicas. Após 24

horas, foi realizada uma inspeção visual, sendo CIM definida como a menor concentração do agente que restringiu o crescimento visível bacteriano (observado em comparação a uma coluna controle de esterilidade). O teste foi realizado em triplicata e, como controle positivo, foram utilizados antibióticos padrões preconizados para cada microrganismo.

Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, foram pipetados 10 µL do meio de cultura proveniente dos poços que apresentaram resultados iguais ou maiores que a CIM e, com o auxílio de alça de Drigalski, estes inóculos foram semeados em agar Mueller Hinton. O teste foi realizado em triplicata e, após a incubação a 37 °C por 24 horas, em condições aeróbicas, a CBM (concentração bactericida mínima) foi considerada a menor concentração que causou 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar.

4.11 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração inibitória médias (CI₅₀), concentração citotóxica média (CC₅₀) com limite de confiança de 95%, foram calculadas utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, através do programa *GraphPad Prism* versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística (SOKAL; ROHLF, 1996).

Resultados

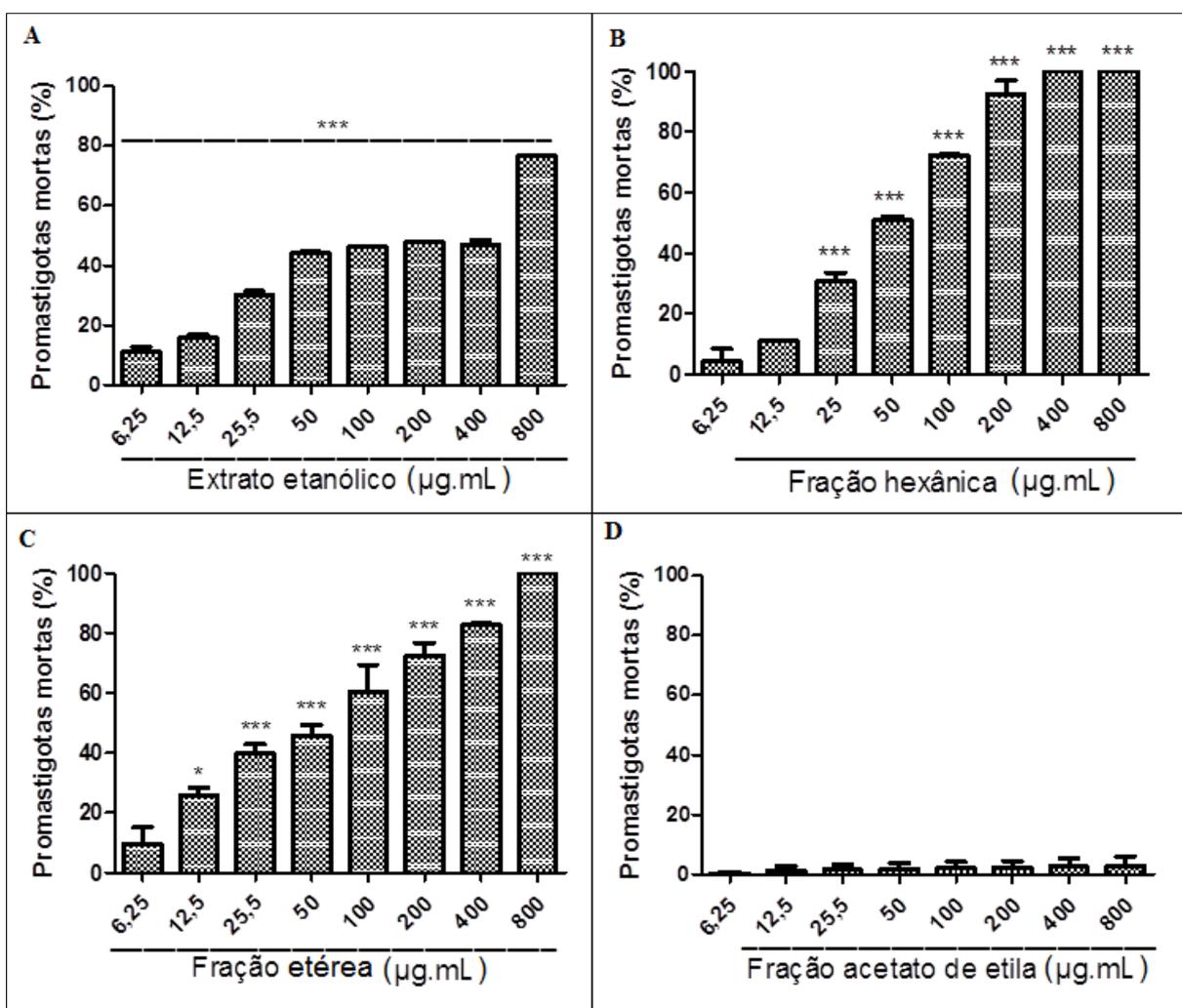


5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito antileishmania do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A avaliação do perfil inibitório do extrato e frações de *P. insignis* foi realizada por ensaios *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Figura 6 – Efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

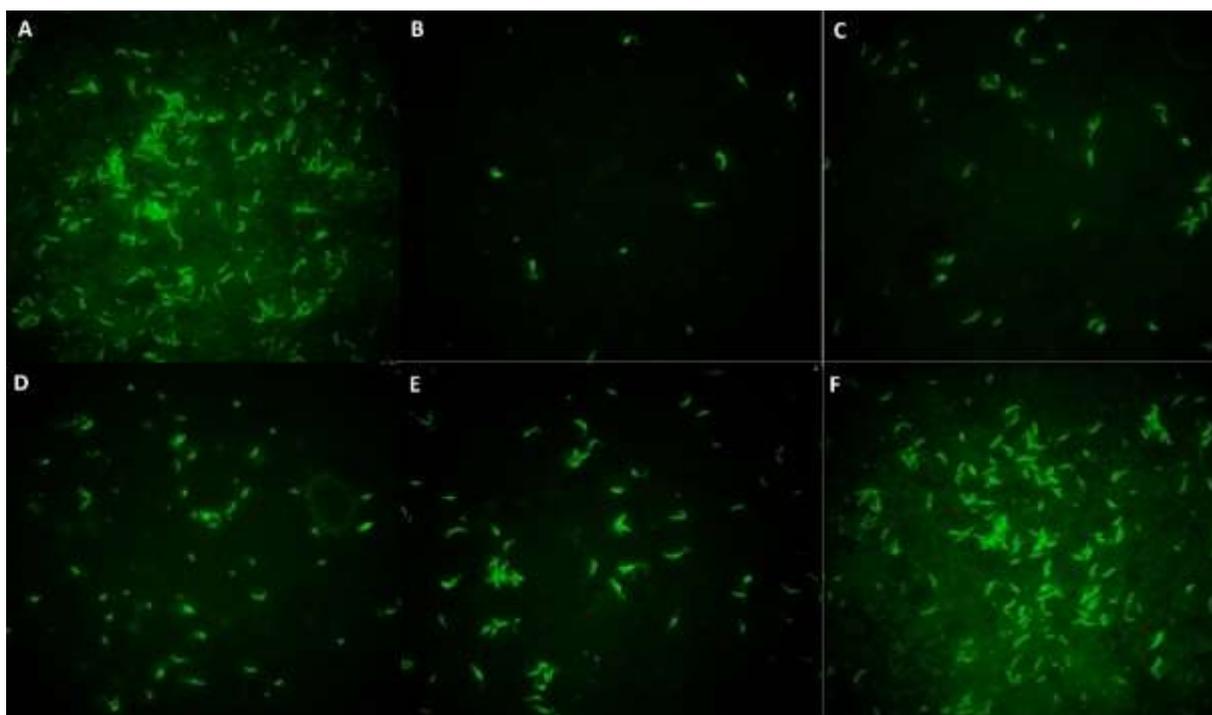


O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100 % de viabilidade. Foi realizado o teste ANOVA *One-way* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) F-Hex; (C) F-Eté e (D) F-AcOEt de *P. insignis* da observada no controle (DMSO 0,2 % em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Os resultados mostram que o Ext-EtOH promoveu inibição estatisticamente significativa para todas as concentrações testadas, entretanto não houve 100% de inibição

mesmo na maior concentração analisada (Figura 6, A), a concentração inibitória média (CI₅₀) foi de 174,24 µg/mL (Tabela 1). A F-Hex foi, dentre as frações testadas, a mais eficiente alcançando 100% de inibição a partir da concentração de 400 µg/mL, com inibição estatisticamente significativa a partir da concentração de 25 µg/mL (Figura 6, B), foi também a fração que exibiu o menor valor de CI₅₀, 45,23 µg/mL (Tabela 1). A F-Eté exibiu eficácia concentração dependente e a partir da concentração 12,5 µg/mL mostra uma diferença estatística quando comparada ao controle, esse fração apresenta 100% de inibição na maior concentração testada, 800 µg/mL (Figura 6,C) e apresenta CI₅₀ de 53,68 µg/mL (Tabela 1), a F-AcOEt não mostrou eficácia contra formas promastigotas (Figura 6, D) e não foi possível calcular o valor da sua CI₅₀ (Tabela 1).

Figura 7 – Micrografias da atividade antileishmania do Ext-EtOH, F-Hex, F-DCM, F-AcOEt, F-Aquo e Ac-B de *P. insignis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Parasitas (1×10^6) foram expostos ao: (A) controle negativo, (B) controle positivo, (C) Ext-EtOH, 174,4 µg/mL; (D), F-Hex, 45,23 µg/mL; (E), F-Eté, 53,68 µg/mL, (F) F-AcOEt, 400 µg/mL durante 48 horas. Aliquota de 10 µL dos parasitos tratados foram utilizadas para realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). O controle negativo foi considerado como 100% de viabilidade das formas promastigotas presente. Controle negativo (DMSO 0,2% em meio Schneider's) e o controle positivo ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anfotericina B – Anf-B em meio Schneider's)

Tabela 1 - Concentração inibitória média (CI₅₀) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Amostras	Promastigotas CI ₅₀ (µg/mL)
Extrato etanólico	174,24
Fração hexânica	45,23
Fração etérea	53,68
Fração acetato	>800,00

Os valores representam a média da CI₅₀ calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para esse cálculo foi utilizado o modelo de regressão de Probit com o programa SPSS 13.0.

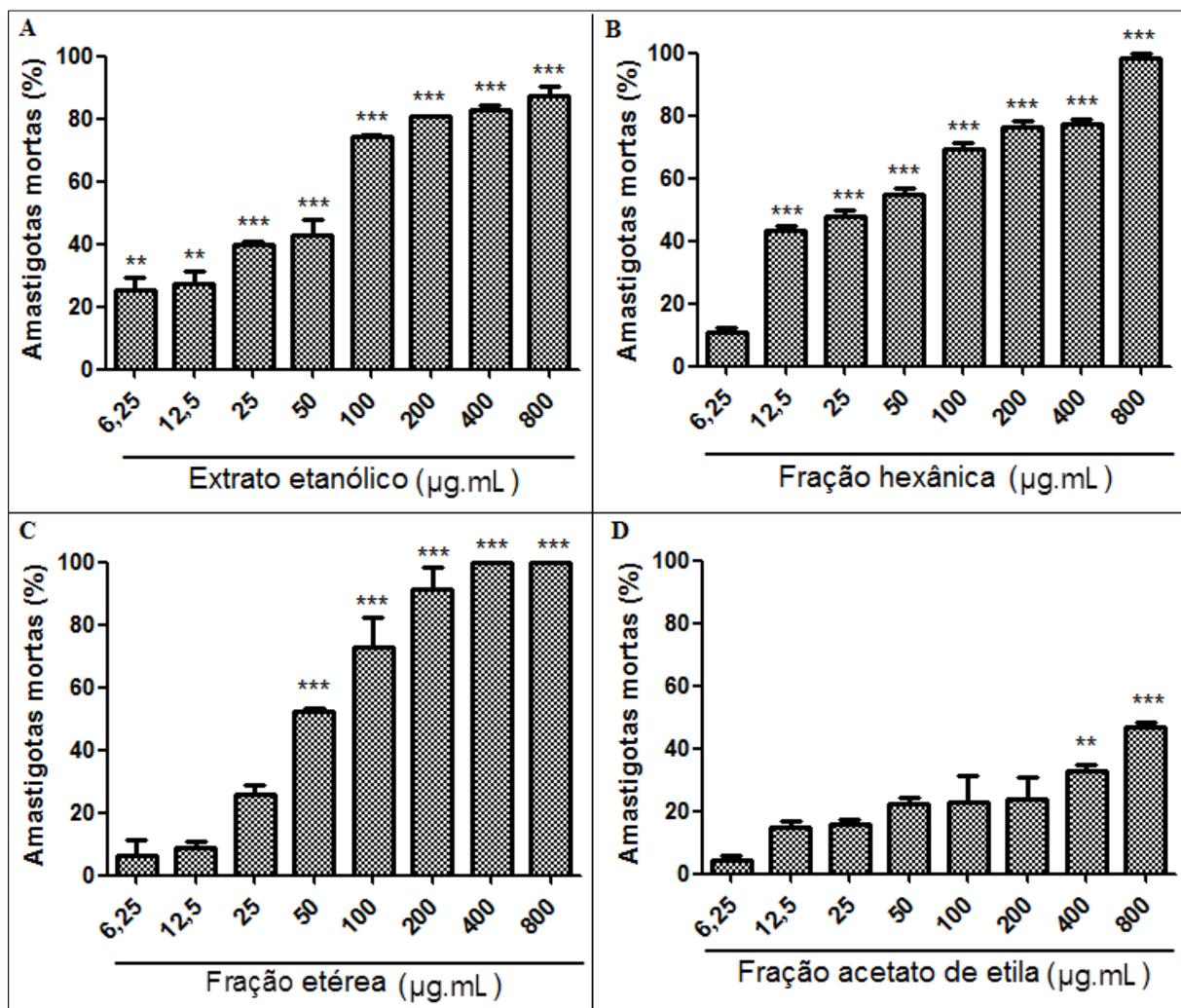
As micrografias apresentadas na figura 7 permitiram visualizar diminuição do número, variação e tamanho das formas promastigotas de *L. amazonensis*, além de possíveis alterações na morfologia do protozoário, resultantes da exposição aos Ext-EtOH e as F-Hex, F-Eté e F-AcOEt nas suas respectivas CI₅₀ por um período de 48 horas. Verificou-se que as promastigotas tratadas com a F-Hex assumiram uma aparência atípica e os parasitas mantidos na presença do Ext-EtOH, F-Eté e F-AcOEt mantiveram sua morfologia normal.

5.2 Avaliação do efeito antileishmania do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

Sobre as formas amastigotas de leishmania o Ext-EtOH exibiu um efeito inibitório dependente da concentração com diferença significativa desde a concentração mais baixa e com uma CI₅₀ de 40,58 µg/mL (Tabela 2), valor inferior ao obtido com as formas promastigotas (Figura 8, A). Para a F-Hex a inibição é significativa a partir da concentração de 12,5 µg/mL e alcança 100% de inibição na maior concentração testada (Figura 8, B), a CI₅₀ foi a menor dentre as amostras testadas, 35,87 µg/mL (Tabela 2).

A F-Eté mostrou diferença estatística a partir da concentração de 50 µg/mL chegando a 100% de inibição a partir da concentração de 400 µg/mL (Figura 8, C), CI₅₀ calculada 46,71 µg/mL (Tabela 2). A F-AcOEt mostrou uma atividade superior àquela apresentada sobre formas promastigotas com diferença significativa quando comparada ao controle a partir da concentração de 400 µg/mL (Figura 8, D), mas não foi possível calcular CI₅₀ (Tabela 2).

Figura 8 – Efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.



O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100 % de viabilidade. Foi realizado ANOVA *One-way* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) F-Hex; (C) F-Eté e (D) F-AcOEt de *P. insignis* da observada no controle (DMSO 0,2 % em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Tabela 2 - Concentração inibitória média (CI₅₀) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

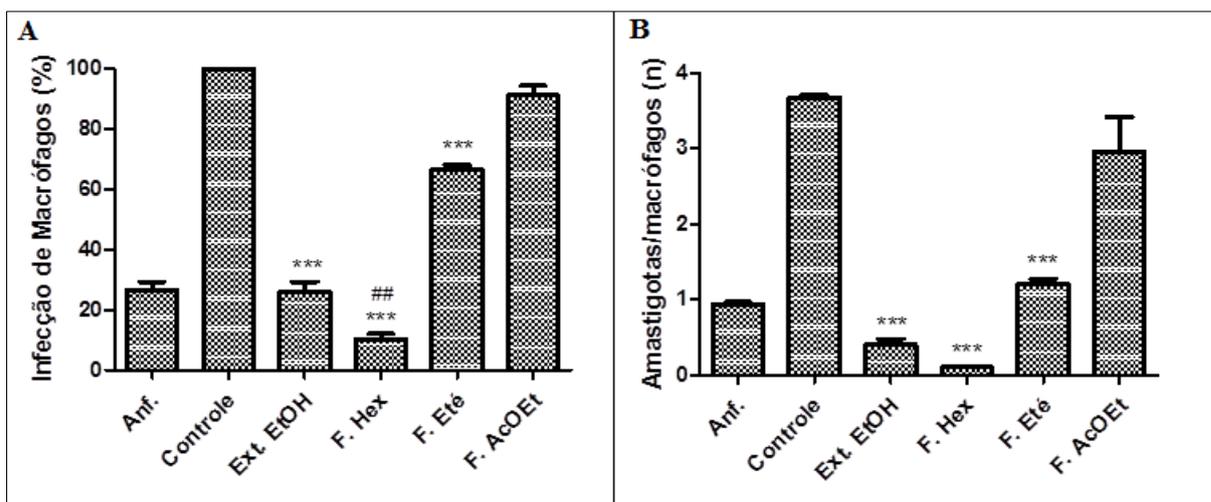
Amostras	Amastigotas CI ₅₀ (µg/mL)
Extrato etanólico	40,58
Fração hexânica	35,87
Fração etérea	46,71
Fração acetato	>800,00

Os valores representam a média da CI₅₀ calculada em ao menos três experimentos independentes \pm erro padrão da média. Para esse cálculo foi utilizado o modelo de regressão de Probit com o programa SPSS 13.0.

5.3 Avaliação do efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*.

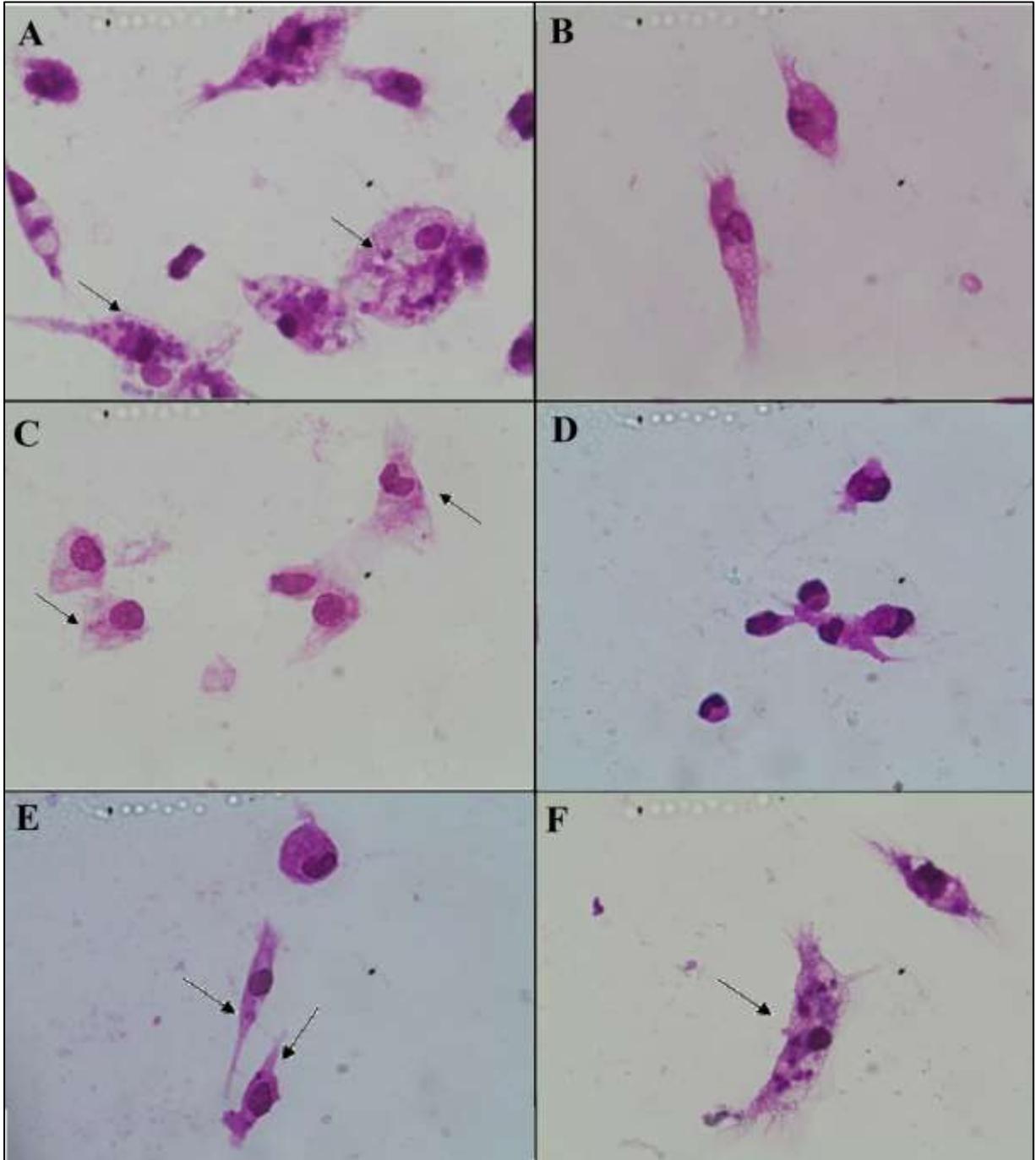
Os resultados referentes ao tratamento dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt são observados na Figura 9. O Ext-EtOH, a F-Hex e a F-Eté conseguiram reduzir significativamente o número de macrófagos infectados, sendo esse efeito mais pronunciado na F-Hex, que mostra diferença estatística inclusive quando comparada ao grupo tratado com anfotericina, a F-AcOEt mostrou uma pequena redução no número de macrófagos infectados, no entanto essa redução não foi significativa (Figura 9, A), as concentrações utilizadas são correspondentes aos valores de CI₅₀ para amastigotas de cada amostra.

Figura 9 – Macrófagos infectados experimentalmente com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.



(A) Percentual de macrófagos infectados, considerando o controle com 100 % de infecção e (b) quantidades de amastigotas por macrófagos infectados, as concentrações utilizadas correspondem ao valor de CI₅₀ para amastigotas de cada amostra. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. ANOVA one-way foi realizado para comparar os grupos com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle e ## $p < 0,01$ em relação ao grupo tratado com anfotericina.

Figura 10 - Macrófagos infectados experimentalmente com formas amastigotas de *L. amazonensis* não tratados e tratados com Anfotericina B, Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.



A - Controle +, macrófagos infectados experimentalmente com formas amastigotas de *L. amazonensis* não tratados; B – tratados com 0,45 µg/mL de anfotericina; C – tratados com Ext-EtOH; D – tratados com F- Hex; E – tratados com a F-Eté; F – tratados com a F-AcOEt. As concentrações das amostras são suas respectivas CI_{50} para promastigotas. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas após 48 horas de exposição. Aumento 100×.

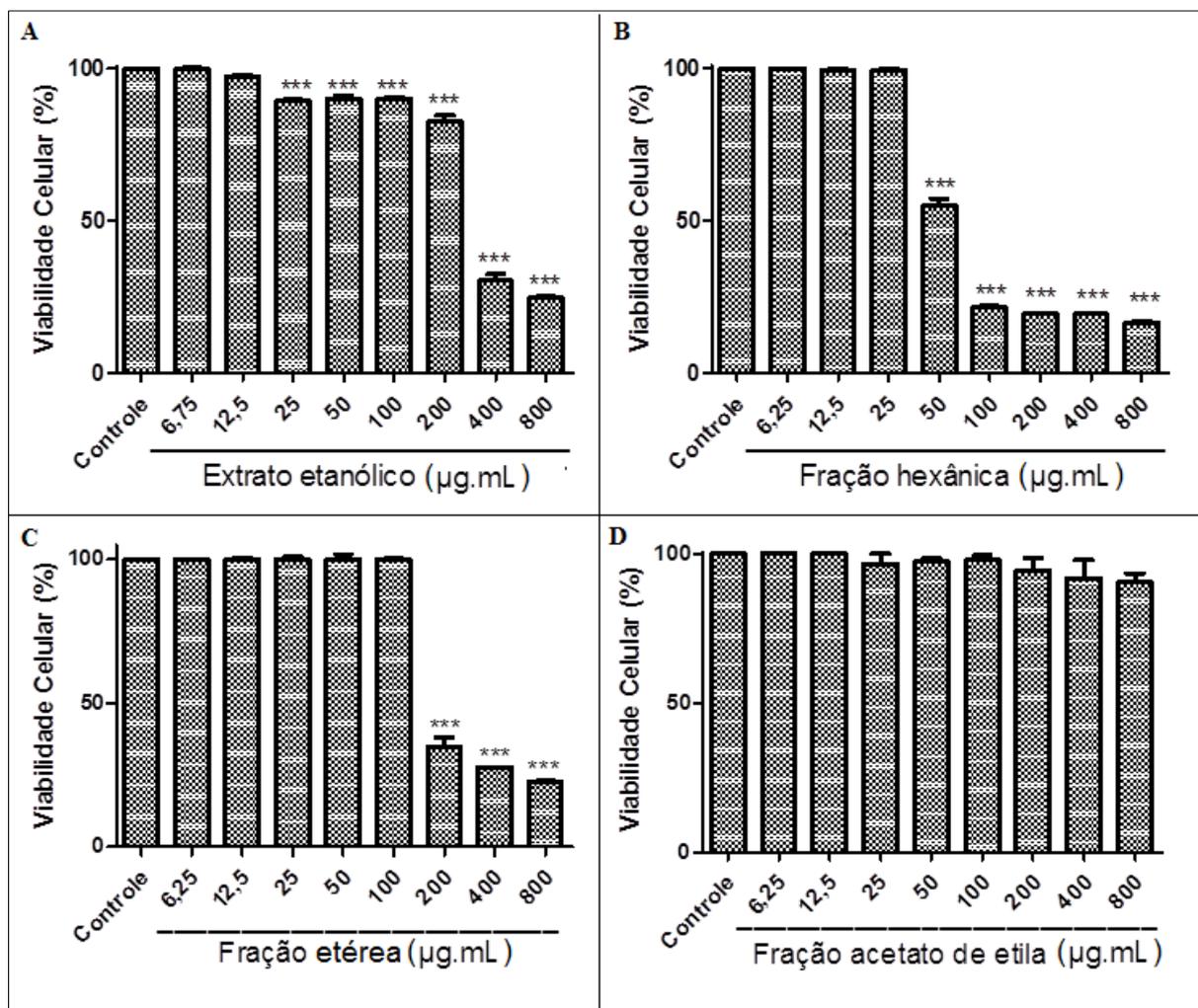
Sobre o número de amastigotas presentes nas células infectadas observou-se uma redução significativa quando comparada ao controle também para o Ext-EtOH, a F-Hex e a F-Eté, para a F-AcOEt não observou-se redução significativa no número de amastigotas por macrófago (Figura 9, B e Figura 10).

5.4 Avaliação da citotoxicidade do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* frente a macrófagos peritoneais murinos.

A avaliação da citotoxicidade do extrato e frações de *P. insignis* foi realizada por ensaios *in vitro* com macrófagos peritoneais murinos, excetuando-se a F-AcOEt, todas as demais amostras demonstraram citotoxicidade (Figura 11), ainda que em graus variados. O Ext-EtOH demonstrou citotoxicidade estatisticamente significativa a partir da concentração de 25 µg/mL, sendo esse efeito mais intenso nas concentrações de 400 e 800 µg/mL (Figura 11, A) a concentração citotóxica média (CC₅₀), que é a concentração capaz de reduzir a viabilidade em 50% dos macrófagos foi calculada e chegamos ao valor de 341,95 µg/mL, utilizando esse valor juntamente com os valores de CI₅₀ para formas amastigotas calculou-se o índice de seletividade para avaliar o nível de segurança do extrato e das frações frente a macrófagos murinos, esse índice representa a relação entre CC₅₀ e CI₅₀ (Tabela 3), para o extrato etanólico apresenta o valor de 8,42, assim esse extrato é 8,42 vezes mais tóxico para formas amastigotas de leishmania do que para macrófagos murinos.

A F-Hex, apresentou expressiva citotoxicidade (Figura 11, B), alterando de maneira significativa a viabilidade das células a partir da concentração de 800 µg/mL estendendo esse efeito com menor intensidade até a concentração de 50 µg/mL, essa fração apresentou o menor índice de seletividade, 1,99 (Tabela 3). A F-Eté apresentou citotoxicidade significativa somente nas concentrações superiores as 200 µg/mL (Figura 11, C), sendo que nas concentrações testadas inferiores a esse valor obteve citotoxicidade quase nula, a CI₅₀ foi calculada e obtemos o valor de 4,97. A F-AcOEt não apresentou citotoxicidade significativa nem mesmo nas maiores concentrações testadas (Figura 11, D), sendo assim não foi possível calcular o valor da CC₅₀ para essa fração (Tabela 3).

Figura 11 – Efeito do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.



Os macrófagos foram incubados por 48 horas. À temperatura de 37 °C em estufa a 5 % de CO₂, na ausência e na presença de diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) F-Hex; (C) F-Eté e (D) F-AcOEt de *P. insignis*. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. ANOVA one-way foi realizado para comparar os grupos com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640) sendo *** $p < 0,0001$.

Tabela 3 - Concentração citotóxica média (CC₅₀) sobre macrófagos murinos, concentração inibitória média (CI₅₀) sobre formas amastigotas do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt em 48 h de exposição e respectivos índices de seletividade.

Amostras	Macrófagos	Amastigota	Índice de seletividade
	CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	
Extrato etanólico	341,95	40,58	8,42
Fração hexânica	71,65	35,87	1,99
Fração etérea	232,29	46,71	4,97
Fração acetato	>800,00	>800,00	>800,00

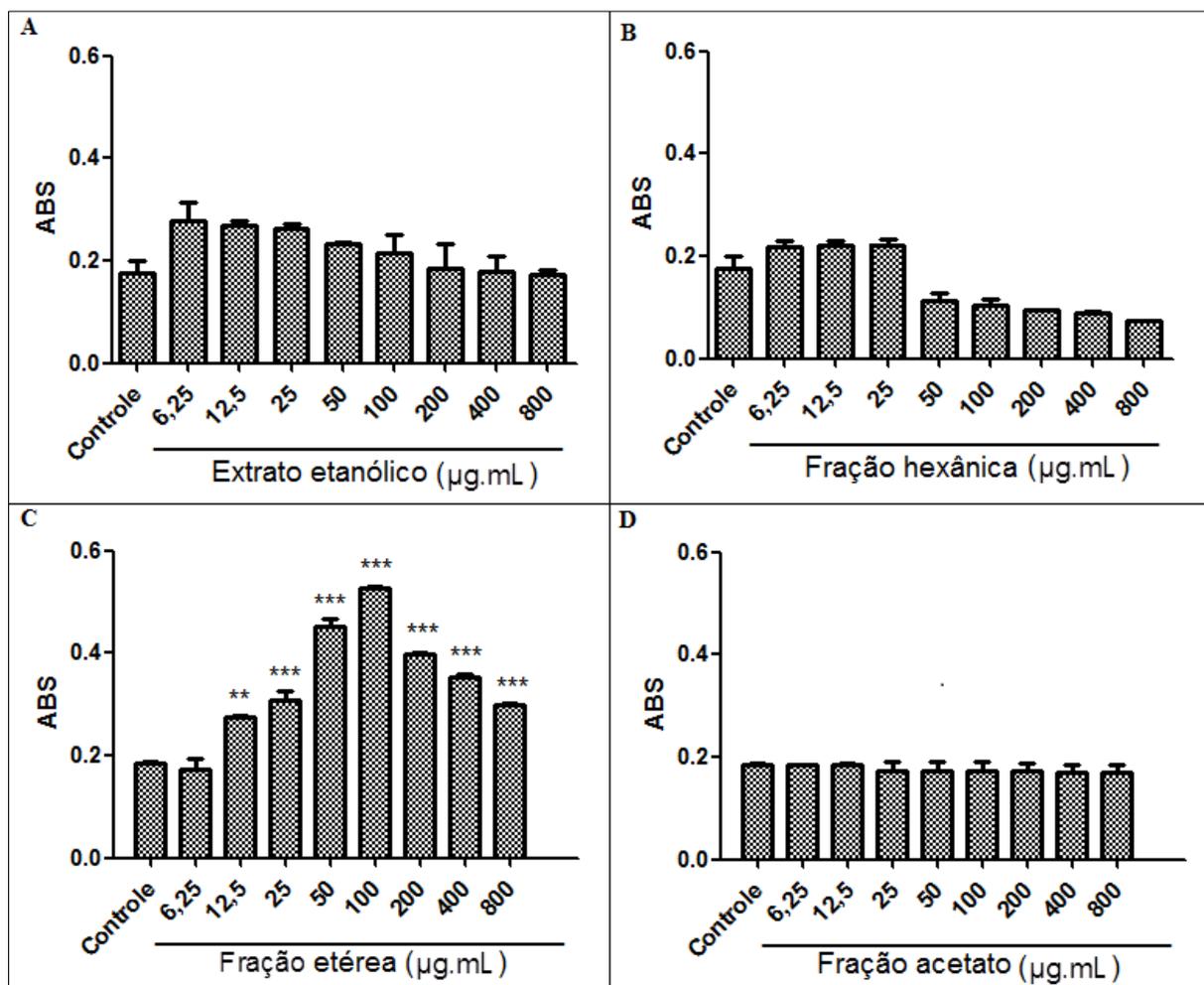
Os valores representam a média da CI₅₀ calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para esse cálculo foi utilizado o modelo de regressão de Probit com o programa SPSS 13.0. Índice de seletividade: CC₅₀/CI₅₀ (ÓSORIO, 2007).

5.5 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pelo Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.

5.5.1 Atividade Lisossomal

A atividade lisossomal foi avaliada pela retenção de vermelho neutro no lisossomo de macrófagos e determinado colorimetricamente. O Ext-EtOH apresentou um pequeno aumento do volume lisossomal das células nas menores concentrações (Figura 12, A), porém tal aumento não teve significância estatística quando comparada ao controle, observa-se no gráfico um declínio progressivo na atividade lisossomal na medida que se aumenta a concentração do extrato, tal efeito é explicado pela citotoxicidade de extrato sobre os macrófagos, acarretando a diminuição na quantidade de células viáveis.

Figura 12 – Atividade lisossomal de macrófagos tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.



O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. One-way ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) F-Hex; (C) F-Eté e (D) F-AcOEt de *P. insignis* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, ABS – Absorbância.

A ação da F-Hex sobre o volume lisossomal é observado na Figura 12 B, podemos notar que o volume lisossomal não sofreu aumento significativo em nenhuma concentração testada, notamos ainda que a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ há uma queda significativa no volume lisossomal dos macrófagos devido citotoxicidade exercida pela fração.

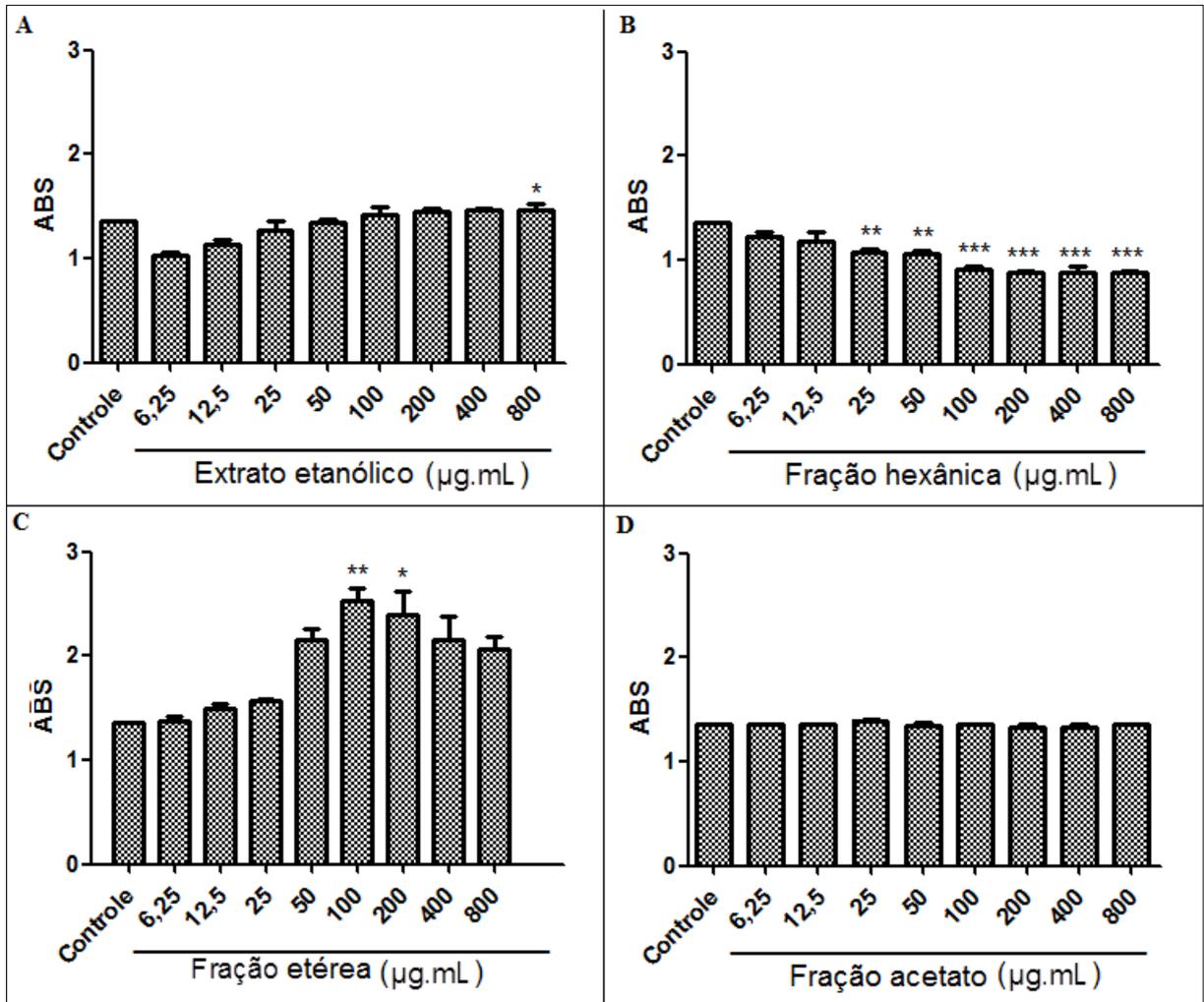
A Figura 12 C representa os resultados obtidos a partir da incubação dos macrófagos com a F-Eté, e mostra que houve aumento significativo do volume lisossomal dos macrófagos incubados com essa substância a partir da concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ com aumento progressivo até 100 $\mu\text{g/mL}$, a partir dessa concentração houve um declínio no volume do compartimento endocítico devido a citotoxicidade dessa fração sobre as células.

A F-AcOEt não provocou alteração no volume lisossomal dos macrófagos tratados em nenhuma concentração estudada, Figura 12 D.

5.5.2 Determinação da capacidade fagocítica

O próximo parâmetro de ativação de macrófagos avaliado foi a fagocitose de partículas de zimosan corado frente a um estímulo externo. Para o Ext-EtOH não houve aumento significativo sobre a capacidade de fagocitose dos macrófagos (Figura 13 A), já a F-Hex exerce uma efeito inverso sobre a capacidade de fagocitose de macrófagos, ou seja, há diminuição da fagocitose mesmo nas concentrações onde praticamente não há toxicidade da fração, concentrações de 6,25; 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13 B). A F-Eté conseguiu aumentar a fagocitose desde a menor concentração, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e esse aumento foi significativo nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, a partir da qual houve queda na fagocitose explicada pela citotoxicidade da fração frente a macrófagos (Figura 13 C). A F- AcOEt não provocou alteração na capacidade de fagocitose dos macrófagos tratados em nenhuma concentração estudada, (Figura 13 D).

Figura 13 – Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.

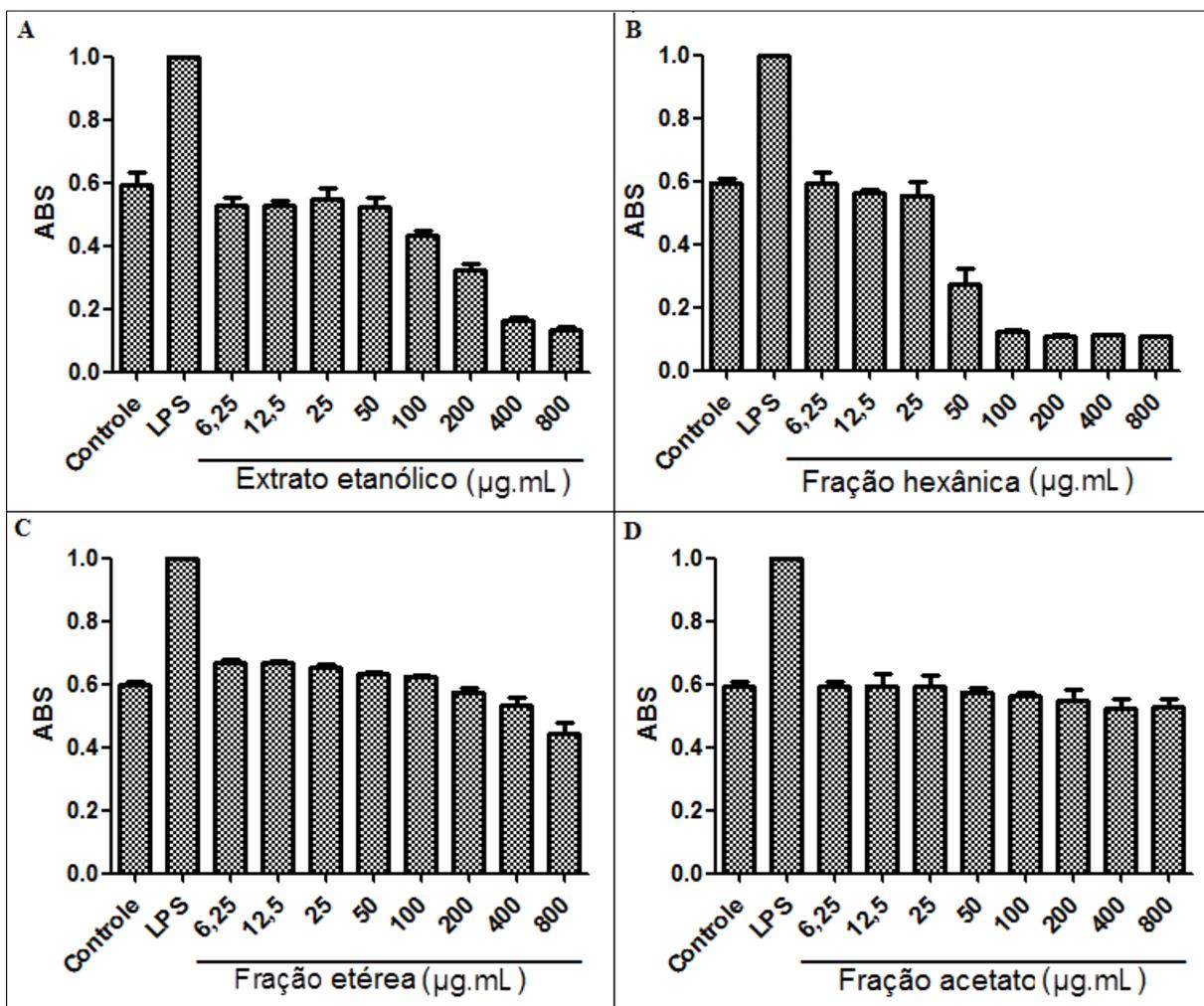


O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) F-Hex; (C) F-Eté e (D) F-AcOEt de *P. insignis* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, ABS – Absorbância.

5.5.3 Produção de Oxido Nítrico

A determinação da produção de óxido nítrico (NO) foi realizada indiretamente pela dosagem de nitritos. Macrófagos aderidos a placa tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* não apresentaram alteração significativa na produção de NO. O Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté apresentaram nas maiores concentrações uma queda na produção devido à toxicidade exercida por essas amostras (Figura 14).

Figura 14 – Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*.



O óxido nítrico foi dosado a partir da concentração de nitritos produzidos por macrófagos tratados Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis*. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) F-Hex; (C) F-Eté e (D) F-AcOEt de *P. insignis* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), ABS – Absorbância e LPS – Lipopolissacarídeo.

5.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt em µg/mL de *P. insignis* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

O Ext-EtOH, a F-Eté e a F-AcOEt não demonstraram ação inibitória ou bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações testadas, a F-Hex apresentou atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Staphylococcus epidermidis* na

concentração de 25,0 µg/mL e ação bactericida contra *Staphylococcus aureus*, MRSA na concentração de 50,0 µg/mL (Tabela 4).

Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Bactéria	Extrato Etanólico		Fração Acetato		Fração Etérea		Fração Hexânica	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	25,0	50,0
MRSA	-	-	-	-	-	-	25,0	50,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	25,0	-
<i>Enterococos faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Os valores representam a média da CIM e CBM calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Valores expressos em µg/mL.

Discussão



6. DISCUSSÃO

A utilização terapêutica das plantas é tão primitiva quanto o aparecimento da raça humana na terra. Precocemente as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas englobavam, em suas essências, princípios ativos que ao serem testados no combate de doenças revelavam empiricamente seu poder curativo (BADKE et al., 2011).

O uso de plantas medicinais pela população tem comprovado que caules, raízes, folhas, sementes e frutos de plantas têm eficácia na cura de diversas doenças, em função disso a observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais e a análise científica de plantas tem ganhado destaque (VEIGA JÚNIOR, PINTO e MACIEL, 2005; SANTOS et al., 2013).

P. insignis é uma espécie que produz um fruto muito utilizado pela população Amazônica, o bacuri. O seu uso vem sendo difundido em outros estados devido ao sabor e o odor característico, sendo comestível na forma industrializada e *in natura*. A utilização etnofarmacológica está relacionada a utilização dos extratos de suas sementes como cicatrizante e anti-inflamatório e atualmente diversas atividades vêm sendo relatadas para todas as partes deste fruto (semente, casca e polpa). A sua composição química apresenta classes de terpenos, xantonas e fenólicos como constituintes majoritários. Dessa forma, o interesse pelo bacuri excede a indústria de alimentos devido ao potencial das atividades biológicas encontradas (YAMAGUCHI et al., 2014).

Em 2012, em estudo realizado por Lustosa relatou-se atividade leishmanicida no tratamento tópico de camundongos Balb/c infectados por *L. amazonensis*, utilizando formulações emulsionadas preparadas a partir da banha/manteiga obtida da semente de *P. insignis*, essas formulações mostraram resultado significativo no tratamento de úlceras quando comparadas ao placebo e a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* das manteigas, indicou indução da ativação de macrófagos (LUSTOSA, 2012). Posteriormente Lustosa e colaboradores (2015), utilizando a fração hexânica obtida a partir da semente do fruto da mesma espécie obteve resultados significantes na indução de ativação de macrófagos murinos (LUSTOSA et al., 2016).

Estudos anteriores sugerem uma potencialidade nos extratos e frações de *P. insignis* isolados da gordura extraída das sementes, a atividade leishmanicida desta gordura originou, inclusive, um pedido de patente (CITÓ et al., 2011) baseada nas atividades das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, e na substância isolada, garcinielliptona, que

apresentaram uma potencial atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (COSTA JÚNIOR et al., 2013a; COSTA JÚNIOR et al., 2013b). A fração hexânica mostrou-se capaz de aumentar do volume lisossomal de macrófagos, assim como a capacidade de fagocitose e estimulação da produção de óxido nítrico por essas células, indicando uma ação imunomoduladora (LUSTOSA et al., 2016).

Uma parte ainda pouco estudada dessa espécie tão promissora é a casca do caule. Essa porção da planta é usada popularmente para tratamento de eczemas, vírus da herpes e tratamento de dermatites (SHANLEY e MEDINA, 2005). Em 2015, COSTA realizou um estudo no qual investigou a composição química da casca do caule de *P. insignis*, preparou o extrato EtOH da casca do caule e esse extrato originou as frações hexânica, etérea e acetato de etila. O fracionamento cromatográfico da F-Hex forneceu os triterpenóides: lupeol, betulina, betulinaldeído, uma mistura dos esteroides: sitosterol, estigmasterol e campesterol e uma substância da mesma classe da garcinielliptona isolada anteriormente das sementes de *P. insignis* por Citó e colaboradores (2011), o floroglucinol: 8,8-dimetil-1-(3-hidroxibenzoil)-2-hidroxi-3,5-di(γ,γ -dimetilalil)-7-(2-isopropenil-5-metilhex-4-enil)-7RHtransbiciclo [3.3.1] nona-2-em-4,9-diona e 8,8-dimetil-1-(3-hidroxibenzoil)-4-hidroxi-3,5-di(γ,γ -dimetilalil)-7-(2-isopropenil-5-metilhex-4-enil)-7RHtransbiciclo [3.3.1] nona-3-em-2,9-diona (COSTA et al., 2015). O lupeol, apesar de ser bastante comum em plantas, é relatado pela primeira vez no gênero *Platonia* e conforme consta na literatura apresenta atividades antimalárica (AJAIYEOBA et al., 2008), antiplasmódica (FOTIE et al., 2006), anti-inflamatória (GEETHA e VARALAKSHMI, 2001), anticâncer (SALEEM et al., 2008), antibacteriana e antifúngica (SHAI et al., 2008) e atividade anti-leishmania (OLIVEIRA, 2014).

O triterpenóide betulina, foi isolado anteriormente nas espécies *Garcinia livingstonei*, *G. epunctata*, *G. hanburyi* e *Pentodesma grandifolia* pertencentes à família Clusiaceae (MULHOLLAND et al., 2013; FOTSO et al., 2014; REUTRAKUL et al., 2010; DJOUFACK et al., 2010), entretanto esse é o primeiro relato no gênero *Platonia*. Atividades como anti-HIV, anti-inflamatória (REUTRAKUL et al., 2010), antitripanossômica (HOET et al., 2007) e citotóxica (GAUTHIER et al., 2006) já foram comprovadas para esse composto.

O betulinaldeído foi isolado anteriormente nas espécies *Clusia obdeltifolia* e *Garcinia livingstonei* também pertencentes a família Clusiaceae (TEXEIRA et al., 2006; MULHOLLAND et al., 2013), em *Platonia* é relatado também pela primeira vez. Atividades como antimicobacteriana e antimalárica já foram relatadas para esse composto

(SUKSAMRARN et al., 2006; THEERACHAYANAN; SIRITHUNYALUG e PIYAMONGKOL, 2007).

A triagem de agentes leishmanicidas, classicamente utiliza formas promastigotas, devido à sua simplicidade e baixo custo do cultivo (FUMAROLA; SPINELLI e BRANDONÍSIO, 2004). Nesta abordagem as formas promastigotas são expostas *in vitro* a diferentes concentrações dos compostos a serem testados e a taxa de inibição do crescimento dos parasitos é determinada após 48 horas de incubação. A avaliação da viabilidade celular é avaliada indiretamente através do corante resazurina, comercialmente conhecida como azul de alamar (AlamarBlue[®]), esse corante tem coloração azul e não-fluorescente, essa é a forma oxidada do indicador redox (resazurina) que, ao ser incubado com células viáveis, penetra na mitocôndria onde sofre redução por enzimas mitocondriais e converte-se em resorufina, de coloração rósea, emitindo fluorescência em 590 nm. Tanto a mudança de coloração quanto a fluorescência podem ser medidas por espectroscopias de fluorescência ou no UV-Vis, esta última sendo proporcional ao número de células viáveis em cultura (PERROT et al., 2003; AL-NASIRY et al., 2007).

Nesse teste o Ext-EtOH, F-Hex e a F-Eté da casca do caule de *P. insignis* demonstraram efetiva atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* dependente de concentração e com CI₅₀ de 174,24; 45,23 e 53,68 µg/mL, entretanto a F-AcOEt não demonstrou ação contra formas promastigotas dessa maneira não foi possível calcular o valor da sua CI₅₀. Costa Júnior e colaboradores (2013a) utilizando a substância garcinielliptona, isolada do extrato hexânico da semente do bacuri chegou a um valor de CI₅₀ de 25.78 µg/mL, demonstrando o potencial da espécie contra *Leishmania*.

A F-Hex foi a única substância capaz de provocar alterações na morfologia dos parasitas, essas alterações podem ajudar a esclarecer o mecanismo de ação de substâncias, para essa fração observou-se uma redução do volume e arredondamento do corpo celular de promastigotas, bem como alterações no flagelo, essas modificações podem ter vários mecanismos de ação possíveis. Sabe-se que componentes lipofílicos ou apolares podem passar facilmente através das membranas citoplasmáticas, afetando estruturas das suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos e torná-las permeável (DI PASQUA et al., 2007). Uma vez atravessando a membrana, podem provocar a coagulação do citoplasma, interrompendo vias metabólicas específicas de lipídeos e proteínas (ULTEE et al., 2000), interferência no processo de divisão celular (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010), ou estimular a despolarização das membranas mitocondriais, o que pode conduzir a célula à necrose ou

apoptose (ARMSTRONG, 2006). Os parasitas tratados com o Ext-EtOH, F-Eté e a F-AcOEt apresentaram morfologia típica, com corpo alongado e presença do flagelo, assim provavelmente não atuam diretamente sobre as formas *L. amazonensis*, podendo-se sugerir que sua atuação seja por inibição de vias metabólicas, diminuindo a atividade parasitária. Desta forma, sugere-se que o mecanismo de ação seja a nível mitocondrial, associando este fato com a diminuição da capacidade de reduzir a rezasurina, sem alterar a morfologia normal do parasita (Figura 7).

Contudo, cabe ressaltar que no ciclo natural a forma promastigota é encontrada apenas no hospedeiro invertebrado, não sendo o alvo para o tratamento das leishmanioses. Diferenças morfológicas e bioquímicas entre as formas promastigota e amastigota são bem descritas e responsáveis pela diferente susceptibilidade observada entre estes dois estágios evolutivos frente a compostos leishmanicidas (CALLAHAN et al., 1997; SERENO e LEMESRE, 1997a; SERENO et al., 1998; FUMAROLA; SPINELLI e BRANDONÍSIO, 2004). Desta forma, nem sempre os resultados obtidos com a pesquisa experimental utilizando promastigotas são relevantes quando se visa o tratamento das leishmanioses.

Dessa forma, faz necessário a utilização de modelos experimentais que produzam resultados mais próximos do modelo animal, assim o ensaio sobre as formas amastigotas tanto internalizadas em macrófagos como de formas axênicas em cultivo são as formas mais eficientes para se relacionar os efeitos antileishmania *in vitro* e *in vivo* (MARTINEZ-ROJANO et al., 2008). Tais ensaios, até meados de 1990, eram realizados utilizando-se amastigotas obtidos de células infectadas *in vitro* ou a partir da biópsia da lesão de animais experimentalmente infectados. Estas metodologias são caras, pouco práticas, produzem número limitado de parasitos e possibilitam a presença de contaminantes do tecido infectado. Além disso, o uso de animais, embora imprescindível em alguns casos, deve ser substituído por métodos alternativos sempre que possível (PETERS et al., 1995; FUMAROLA; SPINELLI e BRANDONÍSIO, 2004).

O desenvolvimento de técnicas para cultivo axênico de amastigotas de leishmania e sua semelhança morfológica, bioquímica e antigênica com amastigotas intracelulares obtidos *in vivo*, tem sido apresentada como uma alternativa para somar a facilidade do cultivo em meio axênico com a vantagem de utilizar-se a forma clinicamente relevante do parasito na triagem de fármacos, a baixo custo e livre de contaminantes celulares (BALANCO et al, 1998; GUPTA; GOYAL e RASTOGI, 2001; DEBRABANT et al., 2004). A avaliação de compostos leishmanicidas utilizando amastigotas axênicas tem apresentado resultados confiáveis,

reprodutíveis e algumas vezes semelhantes aos obtidos com a forma intracelular (CALLAHAN et al., 1997; SERENO e LEMESRE, 1997a, b; CASTILLO et al., 2007).

Nossos resultados mostraram que as formas amastigotas axênicas foram menos resistentes ao tratamento com o Ext-EtOH e suas frações que as formas promastigotas do parasito. A diferença observada na atividade dos compostos contra formas promastigotas e amastigotas axênicas corrobora as diferenças bioquímicas existentes entre as duas formas do parasito (SERENO e LEMESRE, 1997b; CALLAHAN et al., 1997; FUMAROLA; SPINELLI e BRANDONÍSIO, 2004; SERENO et al., 2007).

A CI_{50} sobre formas amastigotas mostrou números menores quando comparados com os obtidos para promastigotas: 40,58 $\mu\text{g/mL}$ para Ext-EtOH; 35,87 $\mu\text{g/mL}$ para F-Hex e 46,71 $\mu\text{g/mL}$ para a F-Eté, a F-AcOEt apesar de apresentar pouca atividade, também mostrou-se mais tóxica para formas amastigotas, mas ainda assim não foi possível calcular a sua CI_{50} . Lustosa (2012) utilizando a banha de bacuri extraída das sementes encontrou um valor de CI_{50} de 3,95 $\mu\text{g/mL}$ para amastigotas.

A forma encontrada no hospedeiro mamífero, amastigota, tem origem no interior do vacúolo parasitóforo, a partir da diferenciação de formas promastigotas regurgitadas pelo vetor e fagocitadas pelos macrófagos. Estas formas não apresentam flagelo livre e são adaptadas à temperatura do organismo do mamífero e ao pH presente no vacúolo parasitóforo, onde se multiplicam. Uma vez dentro do macrófago, as formas amastigotas inibem diversos mecanismos de defesa celular, que deveriam ser responsáveis por sua lise, tais como fusão fagossomo-endossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

Por se tratar de um parasito intracelular, após a triagem inicial dos fármacos utilizando formas axênicas de leishmania, a avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* contra a forma intracelular é o modelo mais próximo do animal sem requerer a utilização do mesmo. Esta metodologia também fornece informações sobre a capacidade do composto de chegar em níveis adequados ao vacúolo parasitóforo, mantendo seu efeito leishmanicida. Este tipo de estudo avalia ainda potenciais efeitos do fármaco sobre a célula, favorecendo ou inibindo o desenvolvimento das leishmanias em seu interior (CHANG, 1980; MORISHIGE et al., 1995). Nestes estudos, classicamente são utilizados macrófagos peritoneais murinos.

Na infecção por *L. amazonensis* realizada no presente estudo, observa-se uma redução significativa no número de macrófagos infectados para o Ext-EtOH, F-Hex e F-Eté, assim como no número de amastigotas por macrófagos, só a F-AcOEt não mostrou diferença significativa

na redução de infecção e redução de amastigotas por macrófagos, observou-se ainda a presença de vacúolos parasitóforos contendo várias amastigotas aderidos à membrana dos mesmos ou soltas em seu interior (Figura 11). Esses vacúolos parecem estar preenchidos por fluido, como se uma pressão os mantivesse armados, fazendo-os parecer esferas dentro dos macrófagos quando as células estão infectadas por *L. amazonensis*. Cabe ressaltar que nem todos os vacúolos produzidos na infecção por *L. amazonensis* em macrófagos apresentam tal morfologia, especialmente em células sofrendo mitose ou com infecção muito elevada, nas quais os vacúolos se tornam pequenos e estão totalmente tomados por amastigotas. ANTOINE et al., (1998) e CHANG et al., (2003) descreveram a presença deste tipo de vacúolo em distintas linhagens celulares quando infectadas por *L. amazonensis*, sugerindo que a formação do vacúolo seja induzida pela espécie de leishmania.

Segundo CHANG (1980), para *L. amazonensis*, a presença destes vacúolos está associada à infecção por parasitos vivos e virulentos, uma vez que os mesmos são ausentes em células infectadas com parasitos mortos fixados ou avirulentos e regridem com o tratamento anti-leishmania.

Na busca de substâncias antileishmania mais seletivas para o parasito e menos tóxica para células do hospedeiro, uma vez que na infecção o parasita encontra-se internalizado em células, faz-se necessário investigar a atividade citotóxica destas espécies contra células de mamíferos. Foram realizados testes de citotoxicidade contra macrófagos peritoneais murinos por meio do ensaio colorimétrico utilizando o 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazolium brometo (MTT). Particularmente, a investigação da ação tóxica de novas substâncias com atividade antileishmania sobre macrófagos é importante, uma vez que são as principais células do hospedeiro vertebrado parasitadas por leishmania (KAMHAWI, 2006; NOGUEIRA et al., 2007).

A técnica do MTT é um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para avaliação de citotoxicidade, sendo também utilizado na triagem inicial em busca de compostos com atividade leishmanicida, quer para formas promastigotas ou amastigotas (SERENO e LEMESRE, 1997b; SERENO et al., 1998; DUTTA et al., 2005). A redução do sal de tetrazólio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide] pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial gera o cristal violeta formazam. O MTT é um sal tetrazólico de coloração amarela ouro e solúvel em água, que ao ser incubado com células em plena atividade metabólica, atravessa a membrana plasmática e, ao entrar em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial é reduzido pelo succinatodesidrogenase presente nas

mitocôndrias a MTT-formazan, uma vez que esta redução somente ocorre em células viáveis, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas no experimento. Os cristais produzidos são insolúveis em água, contudo são solubilizados pelo DMSO e apresentam uma coloração violeta. Assim a viabilidade celular é diretamente proporcional a intensidade da coloração (LOOSDRECHT et al., 1991; DUTTA et al., 2005).

O Ext-EtOH demonstrou um efeito tóxico mais expressivo nas concentrações de 400 e 800 µg/mL, apresentando uma CC₅₀ de 341,95 µg/mL, a F-Hex apresentou valor de 71,65 µg/mL, a F-Eté de 232,29 µg/mL e a F- AcOEt apresentou, entre as substâncias analisadas, o menor efeito tóxico sobre macrófagos, apresentando um valor de CC₅₀ acima de 800,00 µg/mL. Esses valores ao serem comparados a CI₅₀ de formas amastigotas, geraram o índice de seletividade que foi de 8,42; 1,99; 4,97 para Ext-EtOH; F-Hex; F-Eté, respectivamente. A literatura recomenda que para o ensaio de amastigotas internalizadas em macrófagos o índice de seletividade deve ser próximo ou maior que 20 (OSÓRIO et al., 2007). Com isso, apesar do efeito leishmanicida, o extrato e frações estudadas apresentam potencial de toxicidade para células. Por outro lado, fármacos utilizados atualmente na terapia das leishmanioses como por exemplo o Glucantime® tem índice de seletividade abaixo de 1, ou seja, apresenta-se mais tóxico a células que ao próprio parasita. Efeito esse explicitado ao se relacionar os efeitos *in vivo* do fármaco, uma vez que mesmo sendo medicamentos de primeira escolha apresenta-se muito tóxicos e com diversos efeitos colaterais (BERMAN, 1997).

Avaliou-se também parâmetros como ativação de macrófagos, foram analisados dois mecanismos estruturais de atividade antileishmania (volume do compartimento lisossomal e atividade fagocítica), bem como o mecanismo celular da indução da síntese de NO através da modulação do estado de ativação dos macrófagos.

Os macrófagos desempenham diversas funções, incluindo fagocitose, citotoxicidade tumoral, secreção de citocinas e apresentação de antígenos. Eles representam uma linha de defesa contra patógenos e células tumorais reconhecendo e destruindo-as (YOUNG e HARDY, 1995; PETERS et al., 1996; KLIMP et al., 2002). Caracteristicamente, macrófagos ativados demonstram aumento das capacidades de adesão e espriamento, estimulação da síntese de DNA, modificação na secreção de citocinas, aumento de níveis de enzimas lisossomais, aumento de atividade microbicida/tumorocida pelo aumento de NO e espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento de ondulações de membrana que melhoram o desempenho de funções como a locomoção e a fagocitose (CLEARY; KELLY; HUSBAND, 1999). O papel fundamental destas células na defesa do hospedeiro é limitar a disseminação inicial e/ou o

crescimento do patógeno e modular as reações imunológicas subsequentes (STAFFORD, NEUMANN e BELOSEVIC, 2002).

A fagocitose e a atividade lisossomal são funções da imunidade inata, importantes para o controle de infecções e que conduzem à degradação de agentes patogénicos e a apresentação de antígenos (LEE; HARRISON e GRINSTEIN, 2003 e NIEDERGANG e CHAVRIER, 2004). Após a fagocitose do agente patogénico, o fagossoma recém-formado sofre uma fusão com endossomas, seguido por fusão com lisossomas para produzir um fagolisossomo (NIEDERGANG e CHAVRIER, 2004). O fagolisossomo é um compartimento preenchido por enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigénio, em que a maior parte do conteúdo englobado sofre degradação, patógenos fagocitados são, portanto, mortos dentro do fagolisossoma (LOPES et al., 2002; LEE; HARRISON e GRINSTEIN, 2003). Para estudar a atividade lisossomal, analisou-se a incorporação de vermelho neutro nas vesículas secretoras. A capacidade fagocítica foi determinada pela incorporação de partículas de zimozan corados com vermelho neutro. O zimozan consiste em um polissacarídeo oriundo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na forma de pó insolúvel em água. O zimozan tem a capacidade de estimular células de defesa a induzir resposta imunológica do tipo Th1, inclusive aumentando a produção de IFN- γ (WEN-CHI et al., 2011).

Na análise desses parâmetros o Ext-EtOH e a F-Hex e a F- AcOEt não promoveram um aumento significativo da atividade lisossomal em macrófagos bem como não alteraram o volume lisossomal dessas células, sugerindo uma redução do potencial de defesa e afastando esses mecanismos de ação como responsáveis pelos efeitos sobre leishmania. Entretanto a F-Eté mostrou aumento da atividade lisossomal e capacidade fagocítica, que sugere o envolvimento desses mecanismos na sua atividade antileishmania.

A fagocitose e o sistema lisossomal são críticas para a função de macrófagos, por causa das suas funções em internalização, degradação e eventualmente apresentação, de peptídeos derivados de antígenos necessários para a defesa do hospedeiro.

Outra via importante que pode estar envolvida no mecanismo de atividade anti-leishmania é estimulação da produção de NO nos macrófagos. NO foi considerado durante muito tempo o mecanismo mais eficaz envolvido na defesa contra leishmania (GANTT et al., 2001). O NO é sintetizado na sequência da ativação dos macrófagos pelas citocinas, tais como o interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Sabe-se que leishmania é capaz de inibir inúmeras funções do macrófago (RACOOSIN e BEVERLEY, 1997; MATTE E OLIVIER, 2002). A produção de óxido nítrico (NO) é um dos principais mecanismos do

macrófago para destruir o parasito e é apontada, tanto *in vivo* como *in vitro*, como um dos principais mecanismos responsáveis pela destruição do protozoário leishmania quando no interior da célula hospedeira (LIEW et al., 1990) e *L. amazonensis* induz a inibição da síntese de NO por macrófagos de maneira dependente da inativação da enzima óxido nítrico sintetase iNOS (BALESTIERI et al., 2002). Dessa forma, decidimos investigar se o Ext-EtOH e suas frações podem alterar a produção de NO por macrófagos. Para isso, macrófagos peritoneais foram incubados com as amostras e a produção de NO avaliada após 48h pelo método indireto de Griess. Esta produção pode ser estimulada *in vitro*, através da ativação dos macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS), ativando o gene que produz óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e levando à produção de concentrações elevadas de NO pelos macrófagos. Entretanto, os resultados apresentados mostraram que o Ext-EtOH e suas frações não apresentam a capacidade de ativar a iNOS e estimular a produção de NO por macrófagos, sugerindo que a célula tratada com a droga utilize outro mecanismo para a eliminação do parasita.

O ext-EtOH e as F-Hex, F-Eté e F-AcOEt de *P. insignis* foram testadas também contra cepas de bactérias gram-positivas e negativas, o teste de susceptibilidade para a avaliação da atividade antibacteriana, mostrou que nas concentrações testadas a F-Hex mostrou atividade inibitória significativa contra *Staphylococcus aureus*, MRSA e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 25,0 µg/mL, e atividade bactericida para *Staphylococcus aureus*, MRSA na concentração de 50,0 µg/mL. Diante dos resultados desses bioensaios preliminares a F-Hex demonstrou potencial biológico contra bactérias patogênicas e toxicidade ativa, servindo como incentivo na busca de alternativas terapêuticas que possam servir de subsídio para novas fontes racionais a partir de produtos naturais brasileiros. A exemplo, os produtos naturais a ramoplanina e daptomicina, representantes da grande classe dos macrociclos peptídicos naturais que revelaram expressiva atividade contra cepas de *Enterococos* resistentes à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA), e que em breve serão lançados no mercado para combater infecções não susceptíveis ao tratamento com vancomicina (SILVEIRA, et al., 2006).

Conclusão



7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O Ext-EtOH, F-Hex e F-Eté apresentam atividade antileishmania dependente de concentração contra formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- A F-AcOEt não apresentou atividade significativa contra promastigotas de *L. amazonensis*;
- O Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt apresenta atividade contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*;
- O Ext-EtOH, F-Hex e E-Eté mostraram atividade no modelo de infecção de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*, não associada à produção de óxido nítrico, o que sugere a participação de outros mecanismos nessa atividade;
- A F-Eté apresenta atividade contra formas amastigotas e promovem o incremento no volume lisossomal e capacidade fagocítica de macrófagos, mecanismos possivelmente envolvidos na atividade antileishmania.
- O Ext-EtOH, F-Hex, F-Eté e F-AcOEt apresentam baixo potencial citotóxico para macrófagos peritoneais murinos quando comparado com a citotoxicidade obtida para *L. amazonensis*.
- A F-Hex apresenta atividade contra *Staphylococcus aureus*, MRSA e *Staphylococcus epidermidis*.

REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M.; SOUTO-PADRON, T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-parasitic Drugs. *The Open Parasitology Journal*, v. 4, p. 174-87, 2010.
- AGUIAR, L. P.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; SOUSA, V. A. B. Caracterização física e físico-química de frutos de diferentes genótipos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008.
- AJAIYEoba, E. O.; ASHIDI, J. S.; OKPAKO, L.; CHOUGHTON, P. J.; WRIGHT, C. W. Antiplasmodial compounds from *Cassia siamea* stem bark extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 2254-255, 2008.
- ALEXANDER, J; MCFARLANE, E. Can type-1 responses against intracellular pathogens be T helper 2 cytokine dependent? **Microbes and Infection**. v. 10, p. 953-959, 2008.
- AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human reproduction**, 2007.
- ARMSTRONG, J. S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **Bioessays**, v. 28, n. 3, p. 253-260, 2006. ISSN 1521-1878.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. **Trends Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- ANTUNES, R. M. P; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2006.
- ARAÚJO, A. R.; QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; LIMA, L. I.; SA, M. C.; NUNES, P. H. M.; JOANITTI, G. A.; EATON, P.; SOARES, M. J. S.; LEITE, J. R. S. A. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, 2015.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1269-1281, 2000.

BALANCO, J. M. F.; PRAL, E. M. F.; DA SILVA, S.; BIJOVSKY, A. T.; MORTARA, R. A.; ALFIERI, S. C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, v. 116, p. 103-113, 1998.

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRALNETTO, M.; ABRAHAMSOHN I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infection**, 2002.

BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1-458, 2007.

BADKE M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas Mediciniais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, 2011.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clínic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infections Disease**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BHATTACHARYA, S. K.; SINHA, P.K, SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; JHA, T. K.; PANDEY, K.; DAS, V. R.; KUMAR, N.; LAL, C.; VERMA, N.; SINGH, V. P.; RANJAN, A.; VERMA, R. B.; ANDERS, G.; SINDERMANN, H; GANGULY, N. K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 4, p. 591-598, 2007.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.

BONATTO, S. J. R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H. H. P.; VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**. 231,56–62. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. – 2. ed. atual., 3. reimpr. – Brasília : **Editora do Ministério da Saúde**, 2013.

BRENDLE, J.J.; OUTLAW, A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R.; WERBOVETZ, K. A. Antileishmanial Activities of Several Classes of Aromatic Dications. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v.46, p. 797-807, 2002.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**. v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulator guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, 33: 179-189, 2000.

CALZAVARA, B. B. G. Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro, cupuaçuzeiro. **IPEAN, Séries Culturas da Amazônia**, Belém, p.63-68, 1970.

CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A.; SANTANA, L. C. L. R.; SOUSA A. P. L.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-leishmania e mecanismos de evasão anti-leishmania immune response and evasion mechanisms. **VITAE Academia Biomédica Digital**, n. 25, 2005.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J. L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n. 2, p. 410-4, 2007.

CHANG, K.P. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, v. 209, p. 1240-1242, 1980.

CHANG, K. P.; REED, S. G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, n.3, p. 375-90, 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CITÓ, A. M. G.; COSTA JUNIOR, J. S.; SANTANA L. C. L. R.; FREITAS, R. M.; CARVALHO, F. A. A.; FERRAZ, A. B. F.; SAFFI, J.; Atividade do óleo das sementes de *Platonia insignis* Mart como leishmanicida. 2011, Brasil. Patente: Modelo Industrial. Número do registro: PI1101608-6, data de depósito: 15/04/2011, título: "Atividade do óleo das sementes de *Platonia insignis* Mart como leishmanicida"

CLEARY, J. A.; KELLY, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-D-glucan. **Immunology & Cell Biology**, v. 77, p. 395-403, 1999.

CLEMENT, C. R.; VENTURIERI, G. A. Bacuri and cupuasú. Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses. **Florida Science Source**, p.179-192, 1990.

COELHO, 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, p. 476-482, 2010.

COSTA, I. C. G. Constituintes químico e potencial farmacológico das cascas do caule de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, 2015.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Brazilian Journal of Pharmacognos.** Out./Dez. 2008.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacognosia**, 15: 304-309, 2005.

COSTA JÚNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITÃO, G. C. G.; CITO, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITAS, R. M.; Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, Vol.27, No.4-5, Pp. 470-474, 2013a.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FREITAS, R. M.;

SPEROTO, A. R. M.; PERES, V. F.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Vol.112, pp. 34-41, 2013b.

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

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DATA SUS – **Leishmaniose Tegumentar – casos**. Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf> > Acesso em 02 mar 2016.

DEBRABANT, A.; JOSHI, M. B.; PIMENTA, P. F. P.; DWYER, D. M. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 205-217, 2004.

DEOLINDO, P. Exposição de fosfatidilserina em amastigotas intracelulares de *Leishmania (L) amazonensis* e seu papel na modulação da resposta macrofágica. **Tese de doutorado**. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.

DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; MONTEIRO, E. M.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

DJOUFACK, G. L. N.; VALANT-VETSCHERA, K. M.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; LORBEER, E.; ROBIEN, W. Xanthones, biflavanonones and triterpenes from *Pentadesma grandifolia* (Clusiaceae): structural determination and bioactivity. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1055-1060, 2010.

DUARTE, M. C.T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2004.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, p. 119-122, 2005.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179-200, 2010.

FERREIRA, M. S. G. Manejo da espécie *Platonia insignis* Mart. – Bacurizeiro, em florestas secundárias da Amazônia Oriental: proposta para uma produção sustentável. **Tese de Doutorado**, Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal de Brasília, 2008.

FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G.; NKENGFAK, A. E. Lupel long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. **Journal of natural products**, v. 69, p. 62-67, 2006.

FOTSO, G. W.; NTUMY, A. N.; NGACHUSSI, E.; DUBE, M.; MAPITSE, R.; KAPCHE, G. D. W. F.; MAROBELA, K. A.; NGADJUI, B. T.; ABEGAZ, B. M. Epunctanone, a new benzophenone, and further secondary metabolites from *Garcinia epunctata* Stapf (Clusiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, p. p957-964, 2014.

FOUQUÉ, A. Espèces fruitières d'amérique tropicale. **Fruits**, v. 29(5), p. 387-388, 1974.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONÍSIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research Microbiology**, v. 155, p. 224-230, 2004.

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, 167,893–901. 2001.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; LEBRUN, M.; DUFOUR, P.; PICHETTE, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, p. 6713-6725, 2006.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v 76, p.77-80, 2001.

GRANDO, F. C. C.; FELÍCIO, C. A.; TWARDOWSCHY, A.; PAULA, F. M.; BATISTA, V. G.; FERNANDES, L. C.; CURI, R.; NISHIYAMA, A. Modulation of peritoneal macrophage

activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 42,599–605. 2009.

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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Dez. 2010

GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A.K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends Parasitology**, v. 17, n. 3, p. 150-153, 2001.

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

HOET, S.; PIETERS, L.; MUCCIOLI, G. G.; JIWAN, J. L. H.; OPPERDOES, F. R.; LECLERCQ, J. Q. Antitrypanosomal activity of triterpenoids end aterols from the leaves of *Strychnos spinosa* and related compounds. **Journal of natural products**, v 70, p. 1360-1363, 2007.

HSIAO, C. H.; UENO, N.; SHAO, J. Q.; SCHROEDER, K. R.; MOORE, K. C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12, p. 1033-1044, 2011.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand fl ies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitology**, 22, 439- 445. 2006

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology research**, v. 90, n. 2, p. S55-S62, 2003.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; UEZATP, H.; MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 3, p. 814-826, 2010.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 109-121, 2002.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 3, p. 352-357, 2003.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1299-1306, 2003.

LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **The Journal of Immunology**, 144, 4794-4797. 1990.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2006.

LINDOSO, J. A. L.; COSTA, J. M. L.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, 69-77, 2012.

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.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Horizonte Científico**, v. 1, p. 1-11, 2002.

LUSTOSA, A. K. M. F. Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

LUSTOSA, A. K. M. F.; ARCAJO, D. D. R.; RIBEIRO, R. G.; RODRIGUES, K. A. F.; PASSOS, F. F. B.; PIAULINO, C. A.; SILVA-FILHO, J. C.; ARAÚJO, B. Q.; LIMA-NETO, J. S.; COSTA-JÚNIOR, J. S.; CARVALHO, F. A. A.; CITÓ, A. M. G. L. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon rainforest. **Revista brasileira de farmacognosia**, 2016.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **The Journal of Infectious Diseases**. 185, 673-681. 2002.

MARTINEZ-ROJANO, H.; MANCILLA-RAMIREZ, J.; QUIÑONEZ-DIAZ, L.; GALINDO-SEVILLA. Activity of hydroxyurea against *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agent sand Chemotherapy**. 52,3642–3657, N.,2008.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 2005.

MORISHIGE, K.; AJI, T.; ISHII, A.; YASUDA, T.; WATAYA, Y. *Leishmania donovani*: Pilot study for evaluation of therapeutic effects of inosine analogs against amastigotes *in vitro* and *in vivo*. **Experimental Parasitology**, v. 80, p. 665-671, 1995.

MULHOLLAND, D. A.; MWANGI, E. M.; DLOVA, N. C.; PLANT, N.; CROUCH, N. R.; COOMBES, P. H. Non-toxic melanin production inhibitors from *Garcinia livingstonei* (Clusiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p 570-575, 2013.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NASCIMENTO, G. G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiologia**, 2000.

NATERA, S.; MACHUCA, C.; PADRÓN-NIEVES, M.; ROMERO, A.; DIAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. *Leishmania spp.*: proficiency of drug-resistant parasites. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, n. 6, p. 637-642, 2007.

NEITZKE, H. C.; SCODRO, R. B. L.; CASTRO, K. R. R.; SVERSUTTI, A. C. D.; SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U. Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 17-22, 2008.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P., Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 422-428, 2004.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeitos Citotoxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 50-53, 2007.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2003.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2006.

OLIVEIRA, F. P., LIMA E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2007.

OLIVERA, L. G. C. Avaliação das atividades antileishmania, citotóxica e parâmetros de ativação de macrófagos do triterpeno lupeol e da neolignana 2,3- dihidrobenzofurano. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

OMS (Organização mundial de Saúde) – **Report of the Fifth Consultative Meeting On Leishmania/HIV Coinfection-Addis** Ababa, Ethiopia: 20-22, 2007.

OSÓRIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; AZALTE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of colombian *Annonaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

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.

PERROT, S.; DUTERTRE-CATELLA, H.; MARTIN, C.; RAT, P.; WARNET, J. M. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. **Toxicological sciences**. 2003.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2003.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y.D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **Journal of Cell Science**. v. 108, n. 12, p. 3715-3724, 1995.

PETERS, J. H.; GIESELER, R.; THIELE, B.; STEINBACH, F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. **Immunology Today**, v. 17, p. 273-278, 1996.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose tegumentar americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 79-82, 2013.

RACOOSIN E. L.; BEVERLEY S. M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Experimental Parasitology**. 85,283-295. 1997.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JÚNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS, L. D. C.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, 2007. ISSN 1980-8178.

REUTRAKUL, V.; ANANTACHOKE, N.; POHMAKOTR, M.; JAIPETCH, T.; YOOSOOK, C.; KASISIT, J.; NAPASW, C.; PANTHONG, A.; SANTISUK, T.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TUCHINDA, P. Anti-HIV-1 and anti-inflammatory lupanes from the leaves, twigs, and resin of *Garcinia hanburyi*. **Planta Medica**, v 76, p. 368-371, 2010.

ROCHA, L. G.; ARAGÃO, C. F. S.; LOIOLA, M. I. B.; BEZERRIL, R. A.; PAIVA, N. R. F.; HOLANDA, C. M. C. X.; BRITO, E. F. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Jan./Mar. 2009.

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; OLIVEIRA, J. M. G.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; ; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. R.; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.

SALEEM, M.; MADDODI, N.; ZAID, M. A.; KHAN, N.; HAFEEZ, B. B.; ASIM, M.; SUH, Y.; YUN, J. M.; SETALURI, V. S.; MUKHTAR, H. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells *in vitro* and *in vivo* by inducing apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 7, p. 2119-2127, 2008.

SANTIAGO, M. A.; RIBEIRO, F.C.; MOUTA-CONFORT, E.; NASCIMENTO, L. D.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F.; BERTHO, A. L. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi antigens using flow cytometry. **Veterinary parasitology**, v. 154, n. 3, p. 341-346, 2008.

SANTOS JUNIOR, R. Q.; SOARES, L. C.; MAIA FILHO, A. L. M.; DE ARAÚJO, K. S.; SANTOS, Í. M. S. P.; COSTA JÚNIOR, J. S.; SAFFI, J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, 2010.

SANTOS, P. R. P.; CARVALHO, R. B. F.; COSTA JÚNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**. 94 (2): 161-168, 2013.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3097-102, 1998.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 972-6, 1997a.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 83, n.4, p. 401-3, 1997b.

SERENO, D.; CORDEIRO, S. A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**. v. 56, n.1, p. 3-7, 2007.

SHAI, L. J.; McGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentate* (Burm.f) C. A. Sm. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v 119, p238-244, 2008.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Pará: Belém. 54p. 2005.

SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; ABREU-SILVA, A. L.; D'ESCOFFIER, L. N.; CALABRESE, K. S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection: muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 315-318, 2010.

SILVA; J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Out./Dez. 2007

SILVA, E. A. M. Utilização de DNA p36 (lack) na indução de resposta imune e na proteção contra infecção por *Leishmania chagasi* em camundongos balb/c. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; TERENCE, M. M. S. H.; Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006.

SIQUEIRA, E. P. D.; 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 de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 416-421, 2010.

SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, n. 2, p. 135-139, 2007. ISSN 1383-5769.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Critical Reviews in Microbiology**. 28(3), p. 187-248, 2002.

STRATTON, C.W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**. 2000.

SUKSAMRARN, S.; PANSEETA, P.; KUNCHANAWATTA, S.; DISTAPORN, Y.; RUKTASING, S.; SUKSAMRARN, A. Ceanothane - and lupane-type triterpenes with antiparasitic and antimicrobial activities from *Ziziphus cambodiana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 535-537, 2006.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; DIPTI, A.; MADHUKAR, R.; HENRY, W. M. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**. v.362(6): 2010.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J. Single-dose indigenous liposomal amphotericin B in the treatment of Indian visceral leishmaniasis: a phase 2 study. **American Journal of Tropical Medicine**. Dez, 2015.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; BHATTACHARYA, S. K.; RAI, M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S26-S33, 2006.

TARIKU, Y.; HYMETE, A.; HAILU, A.; ROHLOFF, J. Essential-Oil Composition, Antileishmanial, and Toxicity Study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 1009-1018, 2010.

TEXEIRA, J. S. R.; MOREIRA, L. M.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. A new biphenyl from *Clusia melchiorii* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v17, n.4. p. 812-815, 2006.

THEERACHAYANAN, T.; SIRITHUNYALUG, B.; PIYAMONGKOL, S.; Antimalarial and antimicrobial activities of dimeric naphthoquinones from *Diospyros glandulosa* and *Diospyros rhodocalyx*. **Journal of Natural Sciences** 6: 253–259. (2007)

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A. SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233-238, 2000.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MULLER, A.; HOLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 37, p. 13837-13842, 2006.

VEIGA JÚNIOR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

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**, v. 55, p. 79-89, 2011.

WANDERLEY, J. L. M.; COSTA, J. F.; BORGES, V. M.; BARCINSKI, M. Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005. ISSN 0882-4010.

WHO (World Health Organization); **Leishmaniasis: Epidemiology and Access to Medicines - An Update Based on the Outcomes of WHO Regional Meetings, Literature Review and Experts' Opinion**; Geneva, 2012. Available at http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicine/en/,

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **First WHO report on neglected tropical diseases**. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, p. 1-184. World Health Organization, 2010.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, C. V. L.; LIMA, E. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 39-46, 2014.

YOUNG, H. A., HARDY, K. J. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, p. 373-381, 1995.