

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS CASCAS DE
Calycophyllum spruceanum

SUELEM KEIZIANY COSTA NOGUEIRA, UFAM

HUMAITÁ
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-E/0177/2013

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS CASCAS DE
Calycophyllum spruceanum

Bolsista: Suelem Keiziany Costa Nogueira

Orientadora: Prof^a Dr^a Janaína Paolucci Sales de Lima

HUMAITÁ
2014

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Constitui um crescente problema de saúde pública e é considerada uma das endemias de interesse prioritário. Tendo em vista dificuldades de aplicação e toxicidade encontradas em tratamentos com as drogas disponíveis no mercado, um grande número de espécies botânicas é investigado como fontes alternativas de substâncias antileishmania. Neste contexto a família Rubiaceae possui destaque, várias espécies apresentam moléculas potencialmente bioativas. No presente estudo foi realizada avaliação da ação leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, que são as espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana. Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios do Instituto de educação, Agricultura e Ambiente da Universidade Federal do Amazonas (IEAA/UFAM). O extrato etanólico das cascas de *C. spruceanum* não apresentou atividade leishmanicida frente a *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, sendo observado respectivamente, IC₅₀ de 167,15 e 8.933,27 µg/mL. É necessário avaliar outros extratos orgânicos e componentes isolados da espécie para que se possa testá-los a fim avaliar efetivamente sua atividade leishmanicida. Os resultados obtidos neste estudo confirmam a importância da seleção de extrato de plantas usadas na medicina popular nos programas de triagem na busca de novas drogas terapêuticas para Leishmaniose Tegumentar Americana.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic infectious disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, widely distributed in tropical and subtropical regions. Constitutes a growing public health problem, and is considered one of the endemic diseases of priority interest. Due to difficulties to application and toxicity found in the treatment with commercial drugs, a great number of botanic species is investigated as alternative sources of antileishmanial substances. In this context the Rubiaceae family possesses highlighted several species are potentially bioactive molecules. The present study was conducted evaluating the *in vitro* leishmanicidal action of the ethanol extract of the bark of *Calycophyllum spruceanum* against promastigotes of *L. amazonensis* and *L. guyanensis*, which are the causative species of Cutaneous Leishmaniasis. The experiments were conducted at the Instituto de educação, Agricultura e Ambiente da Universidade Federal do Amazonas (IEAA/UFAM) laboratories. The ethanol extract of the bark of *C. spruceanum* showed no leishmanicidal activity against *L. amazonensis* and *L. guyanensis*, being observed, respectively, IC₅₀ of 167.15 and 8933.27 µg.mL⁻¹. It is necessary to evaluate other organic extracts and isolates of the species so you can test them to effectively evaluate their leishmanicidal activity components. The results of this study confirm the importance of selection of plant extracts used in folk medicine in screening programs in the search for new therapeutic drugs for American cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva de crescimento de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	19
Gráfico 2. Atividade leishmanicida de dimetilsulfóxido (DMSO) frente formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	21
Gráfico 3. Atividade leishmanicida de dimetilsulfóxido (DMSO) frente formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	21
Gráfico 4. Atividade leishmanicida da pentamidina frente formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	22
Gráfico 5. Atividade leishmanicida da pentamidina frente formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	22
Gráfico 6. Atividade leishmanicida do extrato etanólico das cascas de <i>Calycophyllum spruceanum</i> frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	23
Gráfico 7. Atividade leishmanicida do extrato etanólico das cascas de <i>Calycophyllum spruceanum</i> frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Taxa de inibição de crescimento do extrato etanólico das cascas de <i>Calycophyllum spruceanum</i> sobre formas promastigotas de leishmania <i>in vitro</i>	23
Tabela 2 - Avaliação da atividade leishmanicida em formas promastigotas <i>in vitro</i> do extrato etanólico das cascas de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 LEISHMANIOSE.....	10
3.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS PLANTAS	11
3.2.1 RUBIACEAE	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	14
4.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE <i>Leishmania amazonensis</i> E <i>Leishmania guyanensis</i>	14
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
4.4 CALIBRAÇÃO DE CONTROLES	15
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i> SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. Amazonensis</i> E <i>L. Guyanensis</i>	16
4.5.1 CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	17
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
5.1 CURVAS PADRÃO DE CRESCIMENTO	19
5.2 CALIBRAÇÃO DE CONTROLES	20
5.3 AÇÃO LEISHMANICIDA NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> spp	22
7. CONCLUSÕES	25
8. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (WHO, 2002).

A importância das leishmanioses (tegumentar e visceral) entre os problemas de saúde pública em geral nos países endêmicos, incluindo o Brasil, é difícil de ser avaliada, em função da deficiência de registros oficiais da maioria dos casos (COSTA, 2005). Lainson (1981) demonstrou a dificuldade que os consultores tiveram de incluí-la entre as seis doenças mais importantes do mundo pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em função da fragilidade dos dados e conhecimentos disponíveis sobre a doença nos países em que a mesma ocorre (LAINSON & SHAW, 1978).

Os parasitas do gênero *Leishmania* alternam entre duas formas: promastigotas, encontradas no trato digestivo do vetor flebotomíneo e as formas amastigotas, as quais são parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos e, raramente, de outros tipos celulares (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O tratamento tradicional da leishmaniose apresenta vários inconvenientes, tais como as vias de aplicação, que são intramuscular ou endovenosa, que podem ser dolorosas e desconfortáveis. Além disso, estas drogas precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que muitas vezes requer hospitalização acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos. Também apresentam alta toxicidade e resistência. Quando administrados por um longo período acarretam hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, e até mesmo, mortes repentinas (BRAGA *et al.*, 2007).

Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos (CARVALHO & FERREIRA, 2001).

Para a utilização de novos quimioterápicos em humanos, faz-se necessária prévia avaliação desses compostos *in vitro* e *in vivo*. Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antileishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

O Brasil é reconhecido pela exuberância e variedade de plantas tropicais, sendo algumas amplamente utilizadas na medicina popular (SUFREDINI *et al.*, 2004). Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES *et al.*, 2000). O efeito leishmanicida dos compostos isolados de espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* (BARATA *et al.*, 2000).

No presente estudo foi avaliada a ação leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico da espécie *Calycophyllum spruceanum* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, que são as espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana mais ocorrentes na Amazônia brasileira.

Pretende-se, com este trabalho, contribuir com subsídios científicos para a formulação de um fitoterápico, ou fármaco, potencialmente eficaz no combate a leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as propriedades de *Calycophyllum spruceanum* encontrados no sul da Amazônia brasileira, contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*, visando contribuir com subsídios científicos para a formulação de fitoterápicos, potencialmente efetivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito leishmanicida in vitro de extratos brutos e frações cromatográficas de *Calycophyllum spruceanum* em formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Avaliar o efeito leishmanicida in vitro de extratos brutos e frações cromatográficas de *Calycophyllum spruceanum* em formas promastigotas *L. guyanensis*.
- Identificação das frações mais promissoras pela concentração inibitória do crescimento parasitário (IC₅₀).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (CROFT E COOMBS, 2003). De acordo com as características clínicas e epidemiológicas da doença, as espécies são classificadas em dois sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*. O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitos digenéticos da ordem kinetoplastida, família Trypanosomatidae (SHAW, 1994).

Os aspectos das leishmanioses variam ainda conforme região geográfica, provavelmente indicando interação entre propriedades dos parasitos locais, biologia dos vetores presentes na área e fatores da população (MURRAY *et al.*, 2005). A evolução da disseminação desta zoonose não se deu de forma similar, daí serem os seus padrões epidemiológicos extremamente diversos a depender da região geográfica e de fatores sócio-culturais da população envolvida. Esta diversidade impossibilita o estabelecimento de padrões epidemiológicos e ecológicos comuns para as diversas regiões, dificultando, assim, a adoção de medidas de controle da doença (ARAÚJO FILHO, 1981; BARRETO *et al.*, 1981; COSTA, 1986; DOURADO, 1989).

Durante seu ciclo de vida, os parasitas circulam entre dois hospedeiros distintos, insetos da ordem Diptera, família Psychodidae (flebotomíneo) e o hospedeiro mamífero. A sobrevivência em organismos tão diversos foi possibilitada pela evolução de formas parasitárias distintas, adaptadas às diferentes condições de vida encontradas em ambos hospedeiros (HANDMAN, 1999).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta-se no Brasil em fase de expansão geográfica onde já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (MS, 2007).

Costa (2005), estudando a epidemiologia das leishmanioses no Brasil, observou que a região Norte destaca-se com 34,9% do total de casos de LTA, com risco de doença de 92,3/100.000 habitantes (cinco vezes a média nacional). A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos da LTA no Brasil, cerca de 37,3% do total de casos registrados no período de 1988 a 2009, e com os coeficientes médios mais elevados de 66,9/100.000 habitantes. As principais espécies mais diretamente envolvidas na LTA no estado do Amazonas são *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. naiffi*, verificou-se uma média em 2010 de 1.130 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 32,40 casos/100.000 habitantes (MS, 2010).

O tratamento tradicional apresenta vários inconvenientes, tais como as vias de aplicação, que são intramuscular ou endovenosa, que podem ser dolorosas e desconfortáveis. Além disso, estas drogas precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que muitas vezes requer hospitalização acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos. Também apresentam alta toxicidade e resistência, quando administrados por um longo período acarretam hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, e até mesmo, mortes repentinas (RATH *et al.*, 2003; TEMPONE *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2007).

3.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS PLANTAS

O Brasil é reconhecido pela exuberância e variedade de plantas tropicais, sendo algumas amplamente utilizadas na medicina popular (SUFREDINI *et al.*, 2004). Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (ALVES *et al.*, 2000).

O uso de plantas no tratamento da LTA é uma prática antiga entre as populações das áreas endêmicas (FOURNET *et al.*, 1992; MOREIRA *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 2002). Geralmente,

as preparações vegetais são utilizadas por via oral ou tópica sobre as lesões cutâneas (NETTO *et al.*, 1985; IWU *et al.*, 1994; AKENDENGUE *et al.*, 1999). Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na LTA pode ocorrer a cura espontânea das lesões (MARSDEN *et al.*, 1984; COSTA *et al.*, 1990; ROSSELL *et al.*, 1992; MARSDEN, 1994).

Diversos compostos químicos, isolados de extratos vegetais, têm comprovada atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania* em ensaios *in vitro*. Já foi relatada a atividade leishmanicida de terpenóides (CAMACHO *et al.*, 2003), aminoglicosteróides e aminosteróides (KAM *et al.*, 1999), naftoquinonas (FOURNET *et al.*, 1992), chalconas (CHEN *et al.*, 1996), glicosídeos iridóides, flavonóides, lignanas (BARATA *et al.*, 2000) e de alcalóides (QUEIROZ, *et al.*, 1996). Apesar dos vários estudos nesta área, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial atividade leishmanicida a serem avaliadas.

A triagem de agentes leishmanicidas, classicamente utiliza formas promastigotas, devido à sua simplicidade e baixo custo do cultivo *in vitro* (FUMAROLA, 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 incubação. No entanto, uma vez que a forma promastigota não é a forma infectante do parasita nos vertebrados, a atividade leishmanicida observada é um valor indicativo da possível atividade do metabólito. A avaliação frente a formas promastigotas então é considerada preliminar (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

3.2.1 RUBIACEAE

A família Rubiaceae é a quarta maior família botânica entre as angiospermas e possui distribuição cosmopolita com 550 gêneros e 9000 espécies, dessas, 2000 são encontradas no Brasil (OLIVEIRA, 2009). Estudos químicos e farmacológicos de metabólitos encontrados em várias partes das plantas da família Rubiaceae têm revelado a presença de iridóides (Ixoroideae),

alcalóides indólicos (Cinchonoideae) e antraquinonas (Rubioidae), considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae (HIROYUKI *et al.*, 1988; BOLZANI *et al.*, 2001). A família é conhecida devido a sua importância econômica e terapêutica, sendo amplamente utilizada na medicina popular e na fabricação de fitofármacos (OLIVEIRA, 2009).

Algumas espécies da família Rubiaceae têm sido amplamente estudadas em todo o mundo, quanto ao seu potencial farmacológico como, por exemplo: *Coffea arabica* (SIMÕES *et al.*, 2001); *Cephaelis ipecacuanha* (MORS *et al.*, 1995); *Psychotria viridis* (CALLAWAY *et al.*, 1996; GROB *et al.*, 1996); *Uncaria tomentosa* (LEMAIRE *et al.*, 1999; PERAZZO, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2005). *Chiococca alba* (EL-ABBADI *et al.*, 1989; CARBONEZI *et al.*, 1999; BORGES-ARGAÉZ *et al.*, 2001; GAZDA *et al.*, 2005); *Morinda citrifolia* (OLIVEIRA, 2009). Estudos anteriores apresentaram investigações biológicas sobre formas promastigotas de leishmania como, por exemplo: *Corynanthe pachyceras* (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001); *Morinda lucida* (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001); *Psychotria Klugii*; *Cephaelis camponutans*, *Cephaelis dichroa*, *Cephaelis glomerulata*; *Craterispermum laurinum*, *Hintonia latiflora* e *Sarcocephalus latifolius* (CAMACHO *et al.*, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

A amostra analisada de *Calycophyllum spruceanum* foi preparada sob orientação do Prof^o Merlotti Fabiano. As cascas foram coletadas no Campus do IEAA/UFAM.

O material botânico seco e moído foi submetido à maceração com solvente etanólico. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida e secos em dessecador. Após a completa secagem o extrato foi pesado para a obtenção do rendimento.

4.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE *Leishmania amazonensis* E *Leishmania guyanensis*

Os parasitas utilizados nesse trabalho foram formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* cepa M4147 (MHOM/BR/75/M4147) oriundas de culturas mantidas crio-preservadas no Instituto de Educação Agricultura e Ambiente (IEAA).

A cultura original da cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8) foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto - São Paulo; cepa M4147 (MHOM/BR/75/M4147) foi cedida pela MsC Maricleide de Farias Naiff, do INPA de Manaus - Amazonas.

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* foi Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Foetal Bovine Serum, GibcoTM, Invitrogen, Brazil) previamente inativado a 56 °C por 30 min e somente adicionado ao meio no momento do uso. O RPMI 1640 foi preparado reconstituindo-se o pó em 1 L de água destilada, adicionando 20 nM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico; GIBCOBRL)

e 50 µg/mL de gentamicina. Depois de preparado o meio RPMI 1640 procedeu-se a esterilização por filtração em membrana de poro 0,22 µm (Millipore).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, constando de oito tratamentos, sendo esses: controle positivo; controle de solvente; controle negativo e extrato nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL) e três repetições.

A avaliação do crescimento dos parasitas foi realizada durante cinco dias através de curvas de crescimento das promastigotas de *L. amazonensis* obtidas a partir de culturas em fase final de crescimento logarítmico. A cada 24 horas, alíquotas das culturas foram diluídas em 1 mL de PBS gelado estéril sendo acrescentados 100 µL de corante Eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,04% (p/v). Após cinco minutos no gelo foi realizada a contagem diferencial das promastigotas em câmara hemocitométrica de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400X. A média aritmética de três contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1 mL de cultura (SILVA-JARDIM, 2001). Os dados obtidos foram analisados segundo a fórmula: n° de parasitas = n° de parasitas contados x inverso da diluição x 10⁴.

O número de leishmanias na forma promastigota foi avaliado em material codificado por dois observadores independentes. Os parasitas corados em vermelho serão considerados mortos e os birrefringentes e móveis considerados vivos. O Cálculo foi realizado considerando apenas o número de parasitas vivos.

4.4 CALIBRAÇÃO DE CONTROLES

Previamente, a pentamidina (PENT) foi testada frente as formas promastigotas de *Leishmania* spp., as concentrações variaram de 6,0 a 100 µg/mL. O solvente Dimetilsulfóxido

(DMSO) utilizado como solvente dos produtos naturais também foi testado em diferentes concentrações variando de 0,1 a 10%, até se encontrar uma concentração que não se ocasiona mortalidade das formas promastigotas.

Aa avaliações da viabilidade das promastigotas na presença de PENT e DMSO foram realizadas segundo o protocolo proposto por Fumarola e colaboradores (2004). Inicialmente, 5×10^5 promastigotas/mL de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, em início de fase estacionária de crescimento foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1000 xg por 10 min em PBS estéril, distribuídas em eppendorfs e incubadas por cinco dias a 24 °C com as diferentes concentrações das amostras. Para verificar o crescimento dos parasitas, diariamente, alíquotas da cultura foram diluídas em PBS gelado contendo o corante Eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,04% (p/v). Realizou-se a contagem dos parasitas em câmara hemocitométrica de Neubauer. Todos os ensaios foram realizados duas vezes em triplicatas.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. Amazonensis* E *L. Guyanensis*

As culturas de promastigotas foram mantidas a 24 °C em meio NNN enriquecido com RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% (SIGMA), L-glutamina 2mM (GIBCO) e os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (SIGMA). Antes de cada experimento foi observado no microscópio a motilidade flagelar dos parasitos.

Para os ensaios, o extrato etanólico foi diluído cinco vezes em meio RPMI completo, obtendo-se a concentração de 1 mg/mL. Deste, foram retirados 100 µL os quais foram diluídos seriadamente, em placas de 96 poços de fundo chato (Costar), na proporção de 1:2 em meio RPMI 1640 suplementado, resultando nas concentrações finais de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. Em cada poço foram adicionados 10 µL da suspensão contendo 5×10^5 formas promastigotas de *L.*

amazonensis e *L. guyanensis* por mL. Pentamidina, droga utilizada no tratamento das leishmanioses, foi utilizado nas mesmas concentrações do extrato. Como controle foram utilizadas as formas promastigotas cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado.

A atividade leishmanicida do extrato foi avaliada pela inibição do crescimento de formas promastigotas após 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação a 24 °C, pela contagem do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar, utilizando-se câmara de Neubauer e microscópio ótico de luz comum. A contagem foi comparada com o controle positivo (crescimento das formas promastigotas sem o extrato), controle do solvente e controle negativo. Cada concentração do extrato foi analisada em triplicata. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (IC₅₀), baseado em Schmeda-Hirschman *et al.*, (1996) e Camacho *et al.*, (2003).

4.5.1 CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

As amostras testadas para a atividade leishmanicida foram desafiadas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. A atividade leishmanicida de cada amostra é representada por 50% de Concentração Inibitória (IC₅₀); classificou-se as amostras como altamente ativa (IC₅₀ < 10 µg/mL), ativo (10 µg/mL < IC₅₀ < 50 µg/mL), moderadamente ativo (50 µg/mL < IC₅₀ < 100 µg/mL) e não-ativo (IC₅₀ > 100 µg/mL) (OSÓRIO *et al.*, 2007).

Os cálculos de IC₅₀ foram realizados utilizando modelo de regressão não-linear através da curva dose-resposta de inibição (Log [inibidor] x resposta), descrevendo a relação existente entre as várias concentrações das amostras e o número de leishmania obtidos nas curvas de crescimento.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada no programa Graph Pad Prism 5.0 pelos métodos tradicionais de análise de variância (ANOVA) e de comparação de médias.

Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* foi efetuada através da diferença entre as médias do número de promastigotas/dia nas diferentes concentrações de uma mesma droga em relação aos controles pela ANOVA de um fator, utilizando o teste de Student-Newman-Keuls, para cada espécie de *Leishmania*.

5. RESULTADOS E DISCUSÕES

5.1 CURVAS PADRÃO DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* apresentaram a fase exponencial tardia e a fase estacionária respectivamente, no sexto e sétimo dia de cultivo (Gráfico 1). Observou-se que estatisticamente não haveria diferença na escolha do quinto, sexto ou sétimo dia de crescimento. O sexto dia de crescimento definiu-se como o dia padrão de uso da cepa para os estudos *in vitro* e *in vivo* de *L. amazonensis* e estudos *in vitro* de *L. guyanensis*.

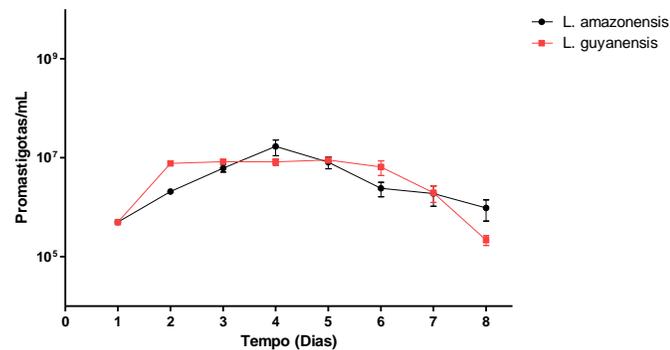


Gráfico 1 Curva de crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). As setas indicadas na figura representam o dia escolhido para a coleta dos parasitas para a realização dos experimentos.

A realização de curvas de crescimento é fundamental para a manutenção e uso das culturas de *Leishmania* spp. É possível determinar a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento de microorganismos em cada sistema de cultivo, a determinação desta fase é importante uma vez que autores sugerem uma associação entre a fase de crescimento da cultura e o sucesso da manutenção da cultura (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1974; BOGDAN, 1990). Com a obtenção das curvas de crescimento e a observação da morfologia das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, determinou-se a fase exponencial tardia e a fase estacionária, sendo assim, possível definir os dias que as cepas tinham a maior probabilidade de estarem infectantes.

Baseado-se nos resultados das curvas de crescimento foi definido o sexto dia para manutenção e uso das cepas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Lima (2012), Passos (2004) e Silva (2008) apresentaram resultados de crescimento de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* semelhantes aos identificados no presente estudo.

5.2 CALIBRAÇÃO DE CONTROLES

O solvente dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,7%, concentração semelhante à usada para as drogas na concentração de 50 µg/mL, não interfere na mortalidade das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* cepa M4147 nos experimentos *in vitro*. As curvas de crescimento de *L. amazonensis* ($F = 4,902$; $P < 0,05$) e *L. guyanensis* ($F = 3,445$; $P < 0,05$) apresentam diferença significativa no crescimento parasitário entre o grupo controle não tratado e os grupos tratados com concentrações de 10, 5 e 2,5% (Gráfico 2e Gráfico 3).

Na literatura são encontrados trabalhos utilizando concentrações variadas de DMSO em formas promastigotas de *Leishmania* spp. concentrações de 0,1; 0,25; 0,7; 1; 1,6 e 5% de DMSO não afetaram formas promastigotas de *L. amazonensis* (QUEIROZ *et al.*, 1996; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1996; WAECHTER *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2007; OSÓRIO *et al.*, 2007; NUNES, 2008; COSTA *et al.*, 2009; SATALAYA, 2009; LIMA, 2012), e concentrações de 0,7; 1,6% de DMSO não afetaram formas promastigotas de *L. guyanensis* (COSTA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2009; LIMA, 2012).

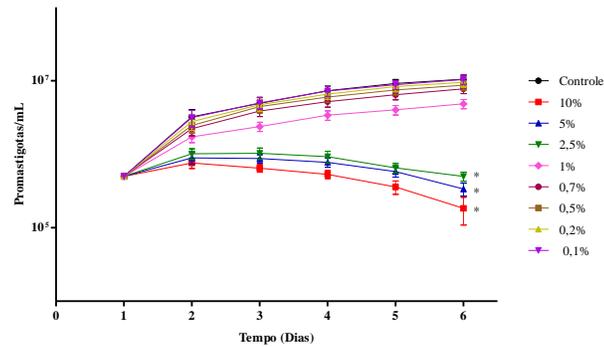


Gráfico 2. Atividade leishmanicida de dimetilsulfóxido (DMSO) frente formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os resultados representam as médias de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem-se a resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *P < 0,05.

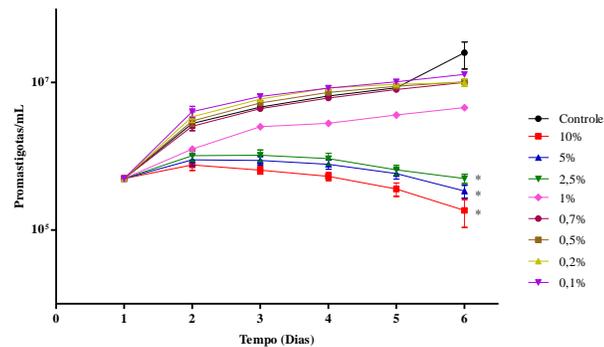


Gráfico 3. Atividade leishmanicida de dimetilsulfóxido (DMSO) frente formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Os resultados representam as médias de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem-se a resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *P < 0,05.

A pentamidina inibiu o crescimento de promastigotas em todas as espécies de *Leishmania* analisadas, não apresentando diferença de sensibilidade. A análise das curvas de crescimento de *L. amazonensis* (F = 14,62; P < 0,0001) e *L. guyanensis* (F = 6,272; P < 0,0001; P < 0,001; P < 0,05) apresentam diferenças significativas no crescimento parasitário entre o grupo controle não tratados e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 4 e Gráfico 5).

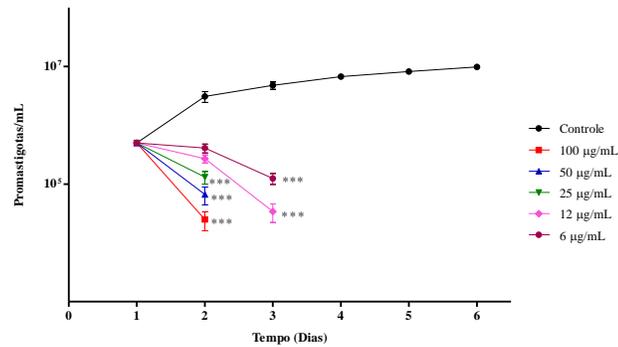


Gráfico 4. Atividade leishmanicida da pentamidina frente formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Os resultados representam as médias de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estaticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05.

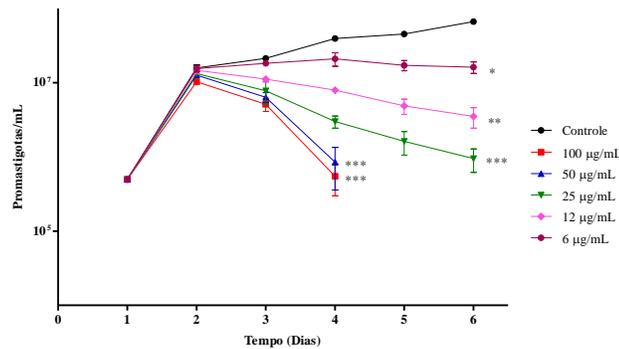


Gráfico 5. Atividade leishmanicida da pentamidina frente formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Os resultados representam as médias de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estaticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05.

5.3 AÇÃO LEISHMANICIDA NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp

A atividade leishmanicida do extrato etanólico de *Calycophyllum spruceanum* foi avaliada pela inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis in vitro* (Tabela 1). As formas promastigotas foram tratadas com as concentrações de 100, 50, 25, 12 e 6 µg/mL do extrato por seis dias. Os resultados expressos em IC₅₀ são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 Taxa de inibição de crescimento do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* sobre formas promastigotas de leishmania *in vitro*

Concentrações (µg/mL)	Número de promastigotas x 10 ⁵ + SD ^a		Inibição de crescimento %	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
100	32,50 ± 5,12	25,33 ± 1,27	19,41	10,59
50	37,33 ± 1,75	29,33 ± 8,04	7,44	0
25	39,50 ± 1,51	29,00 ± 1,06	2,06	0
12	40,16 ± 2,04	27,84 ± 1,24	0,43	1,73
6	40,00 ± 2,09	31,33 ± 8,43	0,82	0
Controle	40,33 ± 1,86	28,33 ± 1,18	0	0
DMSO 0,7% - 50 ^b	38,50 ± 1,04	32,00 ± 7,50	4,54	0
Pentamidina - 50 ^c	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100	100

^a Os resultados representam a média de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95% ± SD, Desvio padrão.

^b Promotor de solubilidade.

^c Droga referência.

Tabela 2 - Avaliação da atividade leishmanicida em formas promastigotas *in vitro* do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum*.

<i>Leishmania</i> spp. ^a	IC ₅₀ (µg/mL) + SEM ^b	Classificação da atividade
PH8	167,15 ± 0,56	Não ativo
M4147	8933,27 ± 1,30	Não ativo

^a PH8, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; M4147 *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

^b IC₅₀, 50% de Concentração Inibitória. Os valores são expressos em média ± SEM.

As promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* não foram sensíveis ao extrato etanólico. As curvas de crescimento de *L. amazonensis* (F = 2,998; P > 0,05) e *L. guyanensis* (F = 1,581; P > 0,05) não apresentam diferenças significativas no crescimento parasitário entre os grupos controle não tratados e tratados com DMSO e os grupos tratados com todas as concentrações testadas (Gráfico 6 e Gráfico 7).

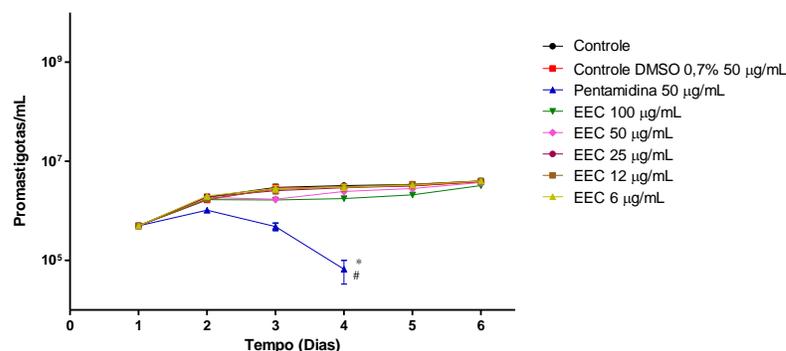


Gráfico 6. Atividade leishmanicida do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* frente a formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os resultados representam as médias de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *P < 0,05. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, #P < 0,05.

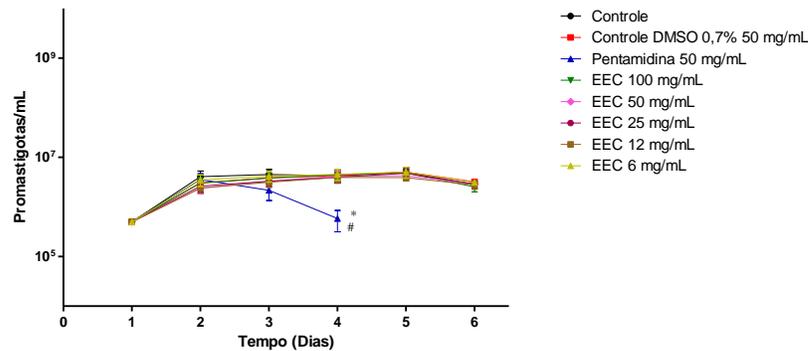


Gráfico 7. Atividade leishmanicida do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* frente as formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Os resultados representam as médias de dois experimentos realizados em triplicata com intervalo de confiança de 95%. As barras indicam o erro padrão da média (SEM). Os asteriscos (*) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao controle sem tratamento, *P < 0,05. Os (#) referem resultados estatisticamente significantes em relação ao tratado com DMSO 0,7%, #P < 0,05.

Os principais tratamentos medicamentosos recomendados para Leishmaniose Tegumentar Americana foram introduzidos mais de 50 anos atrás. Atualmente o tratamento é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito (RATH *et al.*, 2003; CROFT & COOMBS, 2003). A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a conclusão do tratamento (CARVALHO & FERREIRA, 2001; PAULA *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2006).

Considerando as dificuldades de tratamento, a ausência de vacinas e os resultados obtidos referentes à atividade leishmanicida da espécie *Calycophyllum spruceanum* é necessário avaliar outros extratos orgânicos e componentes isolados da espécie para que se possa testá-los a fim avaliar efetivamente sua atividade leishmanicida, contribuindo para o avanço na busca de novas drogas terapêuticas para Leishmaniose Tegumentar Americana.

7. CONCLUSÕES

1. Produtos naturais podem ser uma fonte de novas drogas com alta atividade e baixa toxicidade proporcionando alternativas na substituição de drogas sintéticas no tratamento da leishmaniose sem os indesejáveis efeitos colaterais.
2. A avaliação do efeito leishmanicida do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* no modelo *in vitro* não apresentou atividade frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.
3. A avaliação do efeito leishmanicida do extrato etanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* no modelo *in vitro* não apresentou atividade frente a formas promastigotas de *L. guyanensis*.
4. Os resultados obtidos neste estudo confirmam a importância da seleção de extrato de plantas usadas na medicina popular nos programas de triagem na busca de novos agentes leishmanicidas.

8. REFERÊNCIAS

- AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* 1999, 6(1): 3-8.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA JR., A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000, 95(3): 367-373.
- ARAÚJO FILHO, N.A. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento na Amazônia. *Acta Amazônica* 1981, 11(1): 187-189.
- BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 2000, 55(6): 589-595.
- BARRETO, A.C.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D.; VEXENAT, J.A.; DE BELDER, M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia, Brasil. I. Leishmaniose humana. *Boletim de la Oficina Panamericana de Salud* 1981, 90: 415-424.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion strategies of *leishmania* parasites. *Parasitology Today* 1990, 6(6): 183-187.
- BOLZANI, V.S.; YONG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S. & LOPES, M.N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. Recent Research Development in Phytochemistry, v. 5, p. 19-31, 2001.
- BORGES-ARGÁEZ, R.; BAIZABAL-MEDINA, L.; MAY-PAT, F.; PENÃ-RODRIGUEZ, L.M. Merilactone, an unusual C19 metabolite from the root extract of *Chiococca alba*. *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 228-231, 2001.
- BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 111(2): 396 - 402.
- CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARN, L.P.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, C.S.; MASH, G.S. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmana alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 20, p. 492-497, 1996.
- CAMACHO, M.D.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; SOLIS, P.N.; MARSHALL, S.J.; GHAZANFAR, S. A Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 89(2-3): 185-191.
- CARBONEZI, C.A.; MARTINS, D.; YOUNG, M.C.M.; LOPES, M.N.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v. 51, p. 781-785, 1999.
- CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 2001, 72: 599-618.
- CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18(6): 674 - 88.
- CHEN, Y.Y.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Annona mucosa*. *Journal of Natural Products* 1996, 59(9): 904-906.

- COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; MAIA, B.H.L.N.S.; DUARTE, M.C.T.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Quimica Nova* 2009, 32(1): 78-81.
- COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; FERREIRA, A.G.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.P. A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products* 2006, 69(2): 292-294.
- COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia* 2005, 75(1): 3-17.
- COSTA, J.M.L. Estudo clínico-epidemiológico de um surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra-Bahia. 186 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília (UNB), Brasília, 1986.
- COSTA, J.M.L.; VALE, K.C.; FRANÇA, F.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, J.O.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D.; MAGALHÃES, A.V.; SILVA, C.M.P.; NETTO, A.S.; GALVÃO, C.E.S. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1990, 23(4): 205-208.
- CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* 2003, 19(11): 502-508.
- DOURADO, M.I.C.E.; NORONHA, C.V.; ALCÂNTARA, N.; ICHIHARA, M.Y.; LOUREIRO, S. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública* 1989, 23(1): 2-8.
- EL-ABBADI, N.; WENIGER, B.; QUIRON, J.C.; ANTON, N. New alkaloids of *Chiococca alba*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 603-604, 1989.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNÓZ, V.; HOCQUEMILLER, C.A. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Annals of Tropical Medicine Parasitology* 1992, 43(4): 219-222.
- FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *leishmania* spp. *Research in Microbiology* 2004, 155(4): 244-230.
- GAZDA, V.E., GOMES-CARNEIRO, M.R., BARBI, N. S., PAUMGARTTEN, F.J.R. Avaliação do perfil toxicológico do extrato etanólico das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitch. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 18, p. 136, 2005.
- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, v. 66, p. 89-98, 2005.
- GROB, C.S.; MCKENNA, D.J.; BRITO, J.C.; NEVES, E.S.; OBERLANDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TALCA, C.; MIRANDA, C.T.; STRASSMAN, R.J.; BOONE, K.B. Human psychopharmacology of ayahuasca a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *Mental Disease*, v. 184, p. 86-94, 1996.
- HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 1999, 44: 1-39
- HIROYUKI, T.; TAKEDA, Y.; HIROSHI, N.; KANOMI, A.; OKUDA, T & PUFF, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing iridoid Glycosides. *Phytochemistry*, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.
- IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today* 1994, 10: 65-68.
- KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffi thii*. *Phytochemistry* 1999, 50(1): 75-79.

- KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D.H.; ASHFORD, R.W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1974, 68(4): 269.
- LAINSON, R. Epidemiologia e ecologia de leishmaniose tegumentar na Amazônia. *Hiléia Médica* 1981, 3(1): 35-40.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature* 1978, 273: 596-600.
- LEMAIRE, I.; ASSINEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D.V.C.; ARNASON, J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 109-115, 1999.
- LIMA, J. P. S. Avaliação da atividade leishmanicida de *Annona mucosa*, *Annona sericea* e *Ephedranthus amazonicus* frente a *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. 2012. 184f. TESE (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM) – Manaus - AM.
- MARSDEN, P.D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Três Braços. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1994, 89(3): 485-487.
- MARSDEN, P.D.; TADA, M.S.; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1984, 78: 561-562.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2007, 180 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf> Acessado em: 11/01/2009.
- MOREIRA, R.C.R.; COSTA, J.M.L.; SALDANHA, A.C.; SILVA, A.R. Projeto Buriticupu Maranhão II. Plantas usadas como terapêutica da leishmaniose tegumentar americana na região de Buriticupu-Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1998, 31(1): T248, 126.
- MOREIRA, R.C.R.; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 2002, 18(1): 187-195.
- MORS, W.B.; RIZZINI, C.T. Botânica Econômica Brasileira. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., p. 152 e 179, 1995.
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005, 366(9496): 1561-1577.
- NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2006, 16(1): 61-66.
- NETTO, E.M.; TADA, M.S.; GOLIGHT, K.D.C.; LAGO, E.; BARRETO, A.C.; MARSDEN, P. Conceitos de uma população local a respeito da leishmaniose mucocutânea em uma área endêmica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1985, 18(1): 33-37.
- NUNES, R.K. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense. 2008. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- OLIVEIRA, P. L. DE. Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aubl. Dissertação. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiânia, 2009.
- OSORIO, E.J.D.; ARANGO, G. J.A.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian *Annonaceae*. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, *111*(3): 630-635.
- PASSOS, J.P.S. Padronização de métodos de produção de antígenos de montenegro. 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003, *36*(3): 365-371.
- PERAZZO, F.F. IN CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, p.423, 2004.
- QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *Journal Natural Products* 1996, *59*: 438-440.
- RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova* 2003, *26*(4): 550-553.
- RODRIGUES, F.H.; CARDOSO, S.R.A.; GOMES, M.A.B.; BELETTI, M.E.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, A.H.B.; CANDELORO, I.; SOUZA, M.A. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Veterinary Parasitology* 2006, *139*(1-3): 37-46.
- ROSSELL, R.A.; DURAN, R.J.; ROSSEL, O.; RODRIGUES, A.M. Is leishmaniasis ever cured? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992, *86*(3): 251-253.
- SATALAYA, J.R.; ROJAS J.U.; RÍOS, B.; GRANDEZ, M.; RENGIFO, E.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; GIMENEZ, A.; FLORES, N. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. *Biofarbo* 2009, *17*(2): 23-31.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; MUNOZ, V. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and *jatrophone* from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Research* 1996, *10*(5): 375-378.
- SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their applications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1994, *89*(3): 471-478.
- SILVA, D.G. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania spp.* E análise da atividade leishmanicida de chalconas. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina - SC.
- SILVA-JARDIM, I. Papel dos proteossomas na interação e desenvolvimento de *L. chagasi* em macrófagos murinos. 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto - SP.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTEZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed., *Ed. Universidade/UFRGS* 2003, 1102 p.

- SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2004, 40(2): 139-149.
- SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004, 37(3): 379-384.
- TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE, H.F.; GUALDA, N.C.A.; YOGI, A.; CRAVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 2005, 12: 382-390.
- WAECHTER, A.I.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A.R.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research* 1998, 12(8): 541-544.
- WHO. World Health Organization 2002. The leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/print.htm>> Acessado em 22/12/2008.