

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA,
ANTIPROTEOLÍTICA E ANTIOXIDANTE DE *Arrabidaea*
brachypoda

IVAN DE OLIVEIRA PEREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA,
ANTIPROTEOLÍTICA E ANTIOXIDANTE DE *Arrabidaea*
brachypoda

IVAN DE OLIVEIRA PEREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

COORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos José Marques

ARARAQUARA - SP

2012

Pereira, Ivan de Oliveira

P436d Determinação da atividade leishmanicida, antiproteolítica e antioxidante de *Arrabidaea brachypoda* / Ivan de Oliveira Pereira. – Araraquara, 2012
99 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento

Coorientador: Marcos José Marques

1. *Arrabidaea brachypoda*. 2. Proteases. 3. *Leishmania*. 4. UFLC-MS. I. Sacramento, Luis Vitor do, orient. II. Marques, Marcos José, coorient. III. Título.

Ivan de Oliveira Pereira

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA,
ANTIPROTEOLÍTICA E ANTIOXIDANTE DE *Arrabidaea brachypoda*

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas no
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Araraquara, 20 de Dezembro de 2012.

Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Presidente/orientador

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Dedico este trabalho a todos aqueles que passaram pela minha vida nestes últimos três anos e meio e que, de uma forma ou de outra, participaram da minha formação, pessoal e profissional e, sobretudo, dedico aos grandes amigos que conquistei neste período.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por possibilitar e proporcionar esta conquista.

Aos meus familiares, principalmente meus pais e à Michelle, pela paciência, apoio e, sobretudo, compreensão.

Ao meu orientador, professor Luis Vitor Silva do Sacramento e meu co-orientador, professor Marcos José Marques, pela amizade, confiança, companheirismo e ensinamentos transmitidos, muito além de questões acadêmicas. Ambos sempre foram, e são para mim, exemplos de grandes profissionais, grandes pessoas e grandes amigos.

À amiga Dra. Cláudia Quintino da Rocha, a qual gentilmente me forneceu o elemento básico para a realização deste trabalho, o material vegetal, e sempre se mostra empenhada em ajudar a todos que a procuram.

À mestranda Letícia e a graduanda Karina, pelo auxílio na realização dos testes leishmanicidas e de citotoxicidade.

Ao meu amigo de longa data, Dr. Diego Magno Assis, certamente um dos maiores pesquisadores que já conheci, pelo seu auxílio na realização dos testes enzimáticos e químicos e, sobretudo, pela amizade e paciência.

Ao mestrando Isael Aparecido, pelo fundamental auxílio na realização dos testes anti-oxidantes.

Ao professor Marcelo Henrique dos Santos, da Unifal, pela disponibilização do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal e pela amizade de sempre.

À professora Maria Aparecida Juliano, da Unifesp, por manter sempre seu laboratório de “portas abertas” e ter me acolhido inúmeras vezes com tanta gentileza.

À professora Clara Lúcia Barbieri e a técnica de laboratório Simone, do Laboratório de Parasitologia da Unifesp, pela paciência e ensinamentos que certamente “fizeram a diferença”.

Ao professor Wagner Judice, da Universidade de Mogi das Cruzes, um grande pesquisador, pelo seu apoio incondicional na realização dos testes enzimáticos e compartilhamento de toda a sua experiência.

Aos meus grandes amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a minha motivação e para o desenvolvimento deste trabalho, com suas valorosas discussões, Guilherme, Rudy, Kleber Chavasco, Cosme, Adriano, Adilson e Wesley.

Ao Reitor da UninCor, professor Marcelo Junqueira, pela compreensão em meus momentos de ausência.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, por propiciarem questionamentos e reflexões e por terem participado de muitos dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela oportunidade única.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Infecções causadas por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* representam um dos maiores problemas de saúde pública mundial, com alta endemicidade, sobretudo em países em desenvolvimento. As substâncias de escolha para o tratamento destas parasitoses, de modo geral, causam notória toxicidade renal e cardíaca, além de induzirem resistência no parasito e muitas vezes apresentarem eficácia insuficiente. As plantas são utilizadas no tratamento e cura de enfermidades desde a antiguidade, quando o homem começou a utilizar a natureza em seu favor. Estas plantas, pela sua riqueza química e farmacológica, têm sido estudadas no intuito de comprovar atividades atribuídas pela crença popular e obtenção de novos compostos ativos. Neste contexto, destaca-se a família Bignoniaceae, típica do Cerrado brasileiro, que compreende mais de cem gêneros, entre eles o gênero *Arrabidaea*, que é rico em uma considerável diversidade de compostos, porém muito pouco estudado até o momento, especialmente quando se fala da espécie *A. brachypoda*. Este trabalho visou estudar o extrato das folhas de *A. brachypoda* e determinar suas atividades leishmanicida, antiproteolítica e antioxidante. Após obtido, por percolação, o extrato hidro-etanólico das folhas de *A. brachypoda*, este foi fracionado por partição líquido-líquido em hexânico, acetato-etílico, butanólico e aquoso, e analisados por UFLC-MS para determinação das massas moleculares dos principais constituintes de cada fração, em seguida, o extrato bruto e frações foram avaliados quanto a sua atividade leishmanicida *in vitro*, sua citotoxicidade, e também quanto ao seu potencial inibitório perante proteases obtidas de promastigotas e amastigotas (*pool*), assim como proteases purificadas (oligopeptidases B e C, Catapsina-L e Cruzaína) e recombinantes (rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y), adicionalmente avaliou-se também a atividade antioxidante do extrato bruto e suas frações. Através da análise química, foi possível observar a presença de 15 substâncias majoritárias, subdivididas de acordo com suas polaridades, entre as várias frações obtidas. Na avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*, a fração hexânica mostrou-se mais ativa, seguida pela acetato-etílica, ambas com baixa toxicidade. No intuito de determinar um possível mecanismo de ação, o extrato e frações foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir proteases, sendo o resultado de inibição variável para cada uma delas, não havendo necessariamente uma correlação direta entre a atividade leishmanicida *in vitro* e a atividade inibitória de proteases. Determinou-se também a ausência de atividade antioxidante do extrato bruto e frações, o que favorece a atividade leishmanicida, por não interferir nos mecanismos de ação dos macrófagos. Com estes resultados podemos observar que a polaridade das frações testadas neste estudo podem representar um fator imprescindível na atividade leishmanicida, possivelmente por dificultar o transporte destas substâncias através da membrana citoplasmática, tendo a espécie *A. brachypoda* se mostrado como uma potencial e importante fonte de novos compostos para o tratamento de doenças parasitárias, reafirmando a importância da biodiversidade do Cerrado brasileiro.

Palavras-chave: *Arrabidaea brachypoda*. Proteases. *Leishmania*. UFLC-MS.

ABSTRACT

Infections caused by trypanosomatids of the genus *Leishmania* represent one of the largest global public health problems, with high endemicity, especially in developing countries. The drugs of choice for the treatment of these parasitic infections generally cause notorious heart and kidney toxicity, and induce resistance in parasite and often have insufficient effectiveness. The plants are used in the treatment and cure of illnesses since antiquity, when the man has begun to use nature in his favor. These plants by their chemical and pharmacological wealth, have been studied in order to prove the activities assigned by the popular belief and obtaining new active compounds. In this context, highlight the family Bignoniaceae, typical of the Brazilian Cerrado, which comprises more than a hundred genera, among them the *Arrabidaea* genus, which is rich in a considerable diversity of compounds, however very little studied so far, especially when talking of the specie *A. brachypoda*. This work aimed to study the extract from leaves of *A. brachypoda* and evaluate its leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant activities. After obtained by maceration, the hydro-ethanolic extract from leaves of *A. brachypoda*, this was fractioned by liquid-liquid partition in hexanic, ethyl-acetate, butanolic and watery, and analyzed by HPLC-MS for molecular weights determination of the main constituents from each fraction, then the crude extract and fractions were evaluated on their leishmanicidal activity *in vitro*, their cytotoxicity, and also regarding its potential as protease inhibitor obtained from amastigotes and promastigotes (*pool*), as well as purified proteases (oligopeptidases B and C, Cathepsin-L and Cruzain) and recombinants proteases (rCPB2.8, rCPB3.0 and rH84Y), additionally evaluated the antioxidant activity of crude extract and fractions. Through chemical analysis, it was possible to notice the presence of 15 main substances, subdivided according to their polarity, among the different fractions obtained. On the evaluation of leishmanicidal activity *in vitro*, the hexane fraction proved to be more active, followed by ethyl-acetate, both with low toxicity. In order to determine a potential mechanism of action, the extract and fractions were evaluated on their ability to inhibit proteases, being the result of inhibition variable for each one of them, and there is not necessarily a direct correlation between *in vitro* leishmanicidal activity and inhibitory activity of proteases. It has been determined the absence of antioxidant activity of crude extract and fractions, which favors the leishmanicidal activity, not to interfere with the mechanisms of macrophages action. The results have show that the polarity of the fractions tested in this study may represent an indispensable factor for leishmanicidal activity, possibly by hindering the transport of these substances through the cytoplasmic membrane, having the specie *A. brachypoda* if shown as a potential and an important source of new compounds for the treatment of parasitic diseases, reaffirming the importance of the biodiversity of the Brazilian Cerrado.

Key-words: *Arrabidaea brachypoda*. Proteases. *Leishmania*. UFLC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 Distribuição mundial da leishmaniose cutânea (A) e visceral (B). As áreas afetadas estão marcadas em vermelho.....	22
02 <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , nas formas promastigota em cultura (×1000; A) e amastigota (B). Os amastigotas estão infectando um macrófago (×1000).	24
03 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	25
04 Fotos de <i>A. brachypoda</i>	42
05 Estrutura química dos compostos 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (A), cirsililol (B), cirsimaritina (C) e hispidulina (D), isolados de <i>A. brachypoda</i>	43
06 Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas proteases.....	50
07 Seqüência de obtenção das frações a partir do extrato hidro-etanólico das folhas de <i>A. brachypoda</i> , por partição líquido-líquido com seus rendimentos..	54
08 Perfil cromatográfico (UFLC) do extrato Bruto obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 µm), eluido com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.....	54
09 Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Hexânica obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 µm), eluido com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.....	55

- 10 Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Acetato Etfílica obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluido com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm..... 55
- 11 Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Butanólica obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluido com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm..... 56
- 12 Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Aquosa obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluido com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm..... 56
- 13 Comparação entre os perfis cromatográficos do extrato bruto e suas frações, obtidos em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluido com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Detecção em 220 nm..... 57
- 14 Espectros de massas dos principais constituintes eluídos nos cromatogramas obtidos por UFLC utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão)..... 58

Figura	Página
15 Curvas de inibição do extrato bruto e frações em diferentes concentrações sobre o <i>pool</i> de proteases extraído de promastigostas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em solução de pH 8,0.....	66
16 Curvas de inibição do extrato bruto e frações em diferentes concentrações sobre o <i>pool</i> de proteases extraído de amastigostas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em solução de pH 5,0.....	66
17 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações em diferentes concentrações perante Oligopeptidase B.....	68
18 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações em diferentes concentrações perante Oligopeptidase C.....	69
19 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease Catepsina-L.	71
20 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease rCPB2.8.....	72
21 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease rCPB3.0.....	73
22 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease rH84Y.....	73
23 Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease cruzaína.....	76
24 Avaliação do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações, em diferentes concentrações, quanto ao potencial seqüestrante de radicais DPPH.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 Valores de IC ₅₀ e IC ₉₀ do medicamento de referência e dos extratos hidroetanólicos do caule, folhas e raiz de <i>A. brachypoda</i> , quanto a atividade antipromastigota de <i>L. (L.) amazonensis</i>	53
02 Porcentagem de inibição de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após tratamento de 72 horas com extrato bruto e frações das folhas de <i>A. brachypoda</i>	63
03 Valores de IC ₅₀ de inibição de crescimento de promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , CC ₅₀ dos macrófagos peritoniais murinos, e cálculo do Índice de Seletividade do extrato bruto e frações, tendo a anfotericina B como substância de referência para atividade leishmanicida.....	64
04 Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade antiamastigota.....	65
05 Valores de IC ₅₀ de inibição do <i>pool</i> de proteases extraídos de amastigotas (pH 5,0) e promastigotas (pH 8,0) de <i>L. (L.) amazonensis</i> , tratados com o extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações.....	67
06 Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre o <i>pool</i> de enzimas de amastigotas.....	67
07 Valores de IC ₅₀ do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações em relação a inibição das Oligopeptidases B e C.....	69
08 Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre oligopeptidase B.....	70
09 Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre oligopeptidase C.....	70
10 Valores de IC ₅₀ do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações em relação a inibição da cisteíno protease Catepsina-L.....	72

Tabela**Página**

11	Valores de IC ₅₀ do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações em relação a inibição da cisteíno protease rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3.0 e rH84Y.....	74
12	Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre Catepsina-L.....	74
13	Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre rCPB2.8.....	75
14	Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre rCPB3.0.....	75
15	Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre rH84Y.....	75
16	Valores de IC ₅₀ do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i> e suas frações em relação a inibição da cisteíno protease cruzaina.....	76
17	Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre cruzaina.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABS = Absorbância
- ACN = Acetonitrila
- CC₅₀ = Concentração citotóxica para 50% das células avaliadas
- Ch = Canal
- CP = Cisteíno proteases
- CPA = Cisteíno protease tipo A
- CPB = Cisteíno protease tipo B
- CPC = Cisteíno protease tipo C
- DMSO = Dimetilsulfóxido
- DNA = Ácido Desoxirribonucléico
- DPPH = 1,1-difenil-2-picrilidrazila
- DTT = Dithiothreitol
- ERO = Espécie Reativa de Oxigênio
- ERN = Espécie Reativa de Nitrogênio
- kDNA = Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
- IC₅₀ = Concentração inibitório para 50% das células ou atividade avaliada
- IFN- γ = Interferom Gama
- iNOS = Óxido Nítrico Sintase Induzível
- MCA = Metilcumarina
- IS = Índice de Seletividade
- mRNA = Ácido Ribonucléico mensageiro
- MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo
- ND = Não determinado
- NO = Óxido Nítrico
- OD = Densidade ótica
- OMS = Organização Mundial de Saúde
- PBS = Tampão Fosfato Salino
- Sb^{III} = Antimonial Trivalente

Sb^V = Antimonial Pentavalente

TFA = Ácido trifluoroacético

UFLC = Cromatografia líquida de ultra-alta-pressão

UFLC-MS = Cromatografia líquida de ultra-alta-pressão acoplada a espectrometria de massas

UV = Ultra violeta

Z-FR-MCA = Carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-7-amido-4-metilcumarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Leishmanioses	20
2.1.1	Aspectos gerais.....	20
2.1.2	Formas clínicas.....	20
2.1.3	Epidemiologia.....	22
2.1.4	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	23
2.1.5	Interação parasito-hospedeiro.....	25
2.1.6	A importância das proteases – seu papel nas interações entre parasitos e hospedeiros.....	26
2.1.6.1	Cisteíno proteases do gênero <i>Leishmania</i>	30
2.1.7	Tratamentos.....	31
2.1.7.1	Resistência ao tratamento.....	34
2.2	Radicais derivados de oxigênio e nitrogênio e sua importância para regular o parasitismo	35
2.2.1	Radicais livres.....	36
2.2.2	Antioxidantes.....	37
2.3	Plantas medicinais	37
2.3.1	Plantas do Cerrado como fonte de moléculas bioativas: gênero <i>Arrabidaea</i>	38
2.3.2	Aspectos econômicos e ecológicos do gênero <i>Arrabidaea</i>	40
2.3.3	<i>Arrabidaea brachypoda</i> Bureau.....	41
3	OBJETIVOS	43

4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Fluxograma de Trabalho	44
4.2	Execução do Plano de Trabalho	44
4.3	Preparo do material para realização dos ensaios	45
4.3.1	Material vegetal.....	45
4.3.2	Modelos biológicos.....	46
4.3.3	Preparo dos extratos.....	46
4.4	Análise cromatográfica / Espectrometria de massas	47
4.5	Ensaio <i>in vitro</i>	47
4.5.1	Avaliação da atividade leishmanicida (promastigotas).....	47
4.5.2	Avaliação da atividade leishmanicida (amastigotas).....	47
4.5.3	Avaliação da citotoxicidade.....	48
4.5.4	Determinação do Índice de Seletividade.....	49
4.5.5	Ensaio de atividade inibitória sobre proteases.....	49
4.5.6	Avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH.....	51
4.6	Análise estatística	52
5	RESULTADOS	52
5.1	Atividade antipromastigota das diferentes partes de <i>A. brachypoda</i>	52
5.2	Fracionamento do extrato bruto das folhas de <i>A. brachypoda</i>	53
5.3	Avaliação por UFLC-EM	54
5.4	Atividade leishmanicida e citotoxicidade	63
5.5	Ensaio enzimático fluorimétrico	65

5.5.1	<i>Pool</i> de enzimas de promastigotas e amastigotas.....	65
5.5.2	Oligopeptidases B e C.....	67
5.5.3	Cisteíno proteases isoladas (rCPB2.8, rCPB3.0, rH84Y e cruzafina).....	70
5.6	Atividade antioxidante	77
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças tropicais causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A infecção afeta cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, e estima-se que surjam de 2,0 a 3,0 milhões de novos casos anualmente. É também considerado que atualmente há uma população de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão de leishmaniose (KEDZIERSKI, 2010).

Apesar das muitas pesquisas realizadas, a quimioterapia de primeira linha é ainda baseada em antimoniais pentavalentes, desenvolvidos há mais de 70 anos, que são tóxicos e promovem a resistência do microrganismo.

Substâncias de segunda escolha, como a Anfotericina B, são mais tóxicas, e embora haja sua formulação lipídica (de menor toxicidade), esta é muito cara para o uso na rotina em países em desenvolvimento (MEHEUS *et al.*, 2010). Assim, há uma grande necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos mais seguros, baratos e efetivos contra as leishmanioses.

Pesquisas com substâncias anti-protozoárias, originárias de plantas medicinais, caracterizam uma tarefa multidisciplinar que envolve pesquisadores e estudantes dos campos da botânica, fitoquímica, parasitologia, farmacologia e medicina (BILLO *et al.*, 2005).

Desde a década de 80, quando mais formais e constantes pesquisas com metabólitos secundários com atividade leishmanicida foi iniciada (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001), até os dias atuais, muitos produtos naturais têm sido relatados por apresentarem atividade anti-protozoária, incluindo naftoquinonas (KAYSER *et al.*, 2000), lignanas (SAUVAIN *et al.*, 1996), triterpenos (SAUVAIN *et al.*, 1996), biflavonóides (ASSIS *et al.*, 2012), neolignanas (BARATA *et al.*, 2000), alcalóides (DELORENZI *et al.*, 2001), chalconas (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999) e benzofenonas (PEREIRA *et al.* 2010).

Plantas típicas do Cerrado brasileiro, como as do gênero *Arrabidaea* são reconhecidamente valiosas fontes de compostos bioativos (BRASIL, 2004), embora pouco estudadas até o momento, especialmente a espécie *A. brachypoda*, que apresenta poucas atividades biológicas relatadas até então (ROCHA *et al.*, 2011). Assim, propõe-se a avaliação desta espécie quanto a atividade leishmanicida e sua toxicidade *in vitro*, além da busca de

possíveis mecanismos de ação (potencial antiproteolítico e antioxidante) e o estudo químico de seus principais constituintes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

2.1.1 Aspectos Gerais

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados que pertencem a ordem Kinetoplastida, família Trypanozomatidae e gênero *Leishmania*. Este conjunto de doenças possui, além do impacto sócio-econômico, a segunda maior incidência parasitária, logo após a malária (LAINSON; SHAW, 1992). Os protozoários da ordem Kinetoplastida se caracterizam pela presença de uma única mitocôndria, caracterizada pela presença de maxi e mini círculos (kDNA) (LAINSON; SHAW, 1987).

Existem evidências de que esta doença já estivesse presente nas Américas nas civilizações pré-inca, antes da chegada dos conquistadores neste continente. Todavia, a primeira descrição científica foi feita por Leishman e Donovan em 1903.

2.1.2 Formas Clínicas

Uma das características mais marcantes do gênero *Leishmania* é a diversidade das manifestações clínicas. Havendo as formas tegumentares, com a forma cutânea, a forma cutânea difusa e a forma mucocutânea, e as formas viscerais, que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (HEPBURN, 2000).

A forma clínica cutânea da leishmaniose também é conhecida como ferida brava ou úlcera de Bauru. Esta é a forma mais comum de leishmaniose e caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas de vários tipos, geralmente manifestando-se como úlcera crônica que pode

disseminar progressivamente afetando linfonodos e causando metástases (ASHFORD, 2000; HEPBURN, 2000).

Depois de um período de incubação, que varia de duas semanas a dois meses, aparece a lesão inicial, que é geralmente única, crescendo lentamente e ulcerando depois de alguns meses. As lesões podem chegar a medir vários centímetros com características típicas como contornos regulares, inodoras, pouco exsudativas e com fundo granuloso. Também se observam outros tipos de lesões como úlcero-crostosas, ectimatóides, úlcero vegetantes, verrucosas e outras. As lesões da pele podem curar espontaneamente, deixando cicatrizes visíveis após curso crônico de meses a anos (MS, 2007).

Na forma cutânea difusa, as lesões são papulosas ou nodulares deformantes, não se observando ulceração das lesões. Estas se distribuem amplamente na superfície corporal, onde são encontrados abundantes macrófagos repletos de amastigotas. Esta forma de leishmaniose se apresenta raramente, não cura espontaneamente, é de difícil tratamento e apresenta recaída após a terapia (SOUZA *et al.*, 2006).

A leishmaniose mucocutânea caracteriza-se por lesões tardias, que surgem geralmente meses ou anos após a cura de uma lesão cutânea, preferencialmente no tabique auricular ou nasal, que se estende progressivamente aos tecidos moles, com inflamação e ulceração. Posteriormente a lesão se aprofunda, e nestas lesões se encontram poucos parasitos (MARKELL *et al.*, 2003).

A leishmaniose visceral, também chamada Kalazar, febre negra ou esplenomegalia tropical, é uma doença crônica e endêmica em várias regiões do mundo, afetando especialmente crianças e pessoas imunodeprimidas, caracterizando-se por febre irregular e esplenomegalia (SILVA *et al.*, 2001). O período de incubação varia de dois a oito meses. O início da doença é insidioso, com perda de apetite, palidez, aparecimento de febre alta que é o sintoma mais notável pela sua constância, aumento de volume do baço, anemia e hemorragias da gengiva e digestiva. A alteração do apetite leva a desnutrição grave e a evolução da doença pode ser rápida, levando à morte em algumas semanas. Os pacientes podem apresentar uma forma crônica assintomática desta doença, com curso lento que pode durar anos, ou a forma aguda que é rápida e fatal (THALHOFER, 2010).

2.1.3 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2010), as leishmanioses acometem 12 milhões de pessoas no mundo, em 88 países tropicais e subtropicais, sendo 72 desses considerados em vias de desenvolvimento (Figura 01). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de se contrair a leishmaniose, com 1,5 a 2,0 milhões de novos casos a cada ano (KEDZIERSKI, 2010).

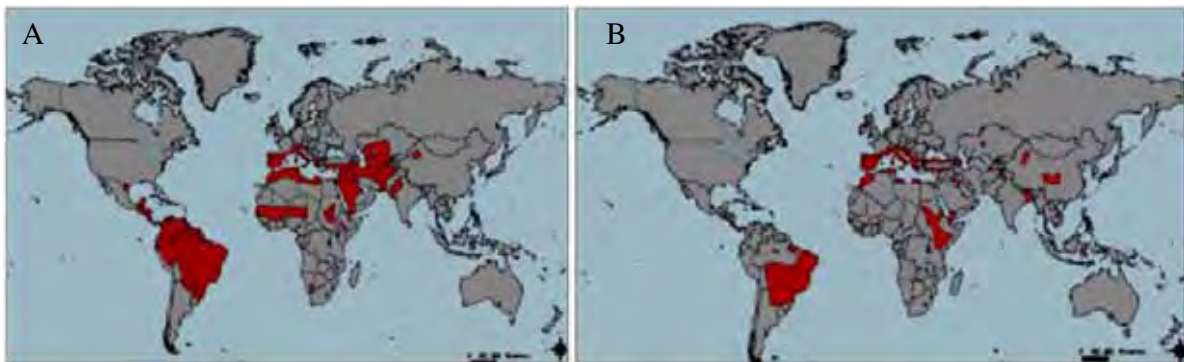


Figura 01 - Distribuição mundial da leishmaniose cutânea (A) e visceral (B). As áreas afetadas estão marcadas em vermelho (WHO, 2010).

Segundo a OMS, de 1,1 milhões de casos anuais correspondem a forma cutânea, ocorrendo principalmente em países em vias de desenvolvimento, na Ásia, África e América Latina. Cerca de 90% dos casos estão concentrados entre Afeganistão, Algéria, Irã, Iraque, Arábia Saudita e Síria, na África, no Brasil e no Peru (KEDZIERSKI, 2010). A incidência anual de novos casos de leishmaniose visceral chega a aproximadamente 0,5 milhão, sendo a maioria destes na Índia, Sudão, Bangladesh e Nepal, na África e Ásia, e no Brasil, nas Américas, onde está distribuída desde os Estados Unidos até o norte da Argentina (SINGH; SINGH; SUNDAR, 2003). Esta forma da doença possui uma vasta distribuição geográfica, incluindo regiões tropicais, subtropicais e certas zonas temperadas, sendo considerada endêmica em parte da Ásia, Índia, América Central e do Sul, Baixo Mediterrâneo e alguns países da Europa (LAINSON; SHAW, 1992).

No Brasil, tem-se observado, na última década, a expansão das áreas consideradas endêmicas para as leishmanioses, assim como a eclosão de surtos epidemiológicos em regiões antes consideradas livres dessas doenças. Entre os fatores que contribuem para este crescimento

temos indivíduos que visitam áreas endêmicas ou indivíduos portadores que migram para outras regiões (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006), além de surtos epidêmicos associados à aceleração do desmatamento para as expansões agrícolas e urbanas, entre outras atividades (DESJEUX, 2001).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Abrangendo cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos (ASHFORD, 2000).

Nas Américas, a leishmaniose cutânea é freqüentemente causada pelas espécies *L. (V.) brasiliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*; no Velho Mundo as espécies *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* são as responsáveis por esta forma clínica (GRIMALDI; TESH, 1993; WILLIAMS, 1995). A espécie mais destrutiva, causadora da forma mucocutânea é a *L. (V.) brasiliensis* (ABRAMSON *et al.*, 1995). Na Ásia, África e Europa a leishmaniose visceral pode ser causada por *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) infantum*, enquanto que nas Américas, *L. (L.) chagasi* é responsável por esta forma de leishmaniose (BAILY; NANDY, 1994).

Neste estudo, utilizou-se *L. (L.) amazonensis*, que é uma espécie freqüente nas florestas da Amazônia, seus hospedeiros naturais são os marsupiais e roedores silvestres como *Proechimys*, *Oryzomys*, *Marmosa*, entre outros. Seus vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca*, que têm hábitos de vôo baixo e são pouco antropofílicos (LEWIS; WARD, 1987).

2.1.4 Ciclo biológico da *Leishmania*

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno, envolvendo um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou *Phlebotomus*, no Velho Mundo (KAMHAWI, 2006). Esses pequenos dípteros têm preferência por lugares úmidos e quentes. Estima-se que existam cerca de 400 espécies de flebotomíneos nas Américas, sendo que 50 dessas parecem estar envolvidas na transmissão da *Leishmania* (GAZANION *et al.*, 2012). Além de um vetor invertebrado, o parasito necessita de um hospedeiro vertebrado que atua como reservatório. Dentre esses, temos uma

ampla variedade de roedores, canídeos, marsupiais e humanos. Geralmente o homem participa do ciclo de transmissão como um hospedeiro acidental, quando entra em ambientes de alta transmissão, onde a doença se mantém em função dos reservatórios naturais (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

O protozoário *Leishmania* apresenta duas formas no seu ciclo de vida: a forma extracelular promastigota, que é fusiforme, apresenta núcleo central e possui flagelo, organela relacionada à locomoção do parasito no tubo digestivo do inseto; e a forma amastigota, que é ovalada, não apresenta flagelo visível e é encontrada no interior dos fagolisossomos dos macrófagos (Figura 02) (PETERS *et al.*, 2008).

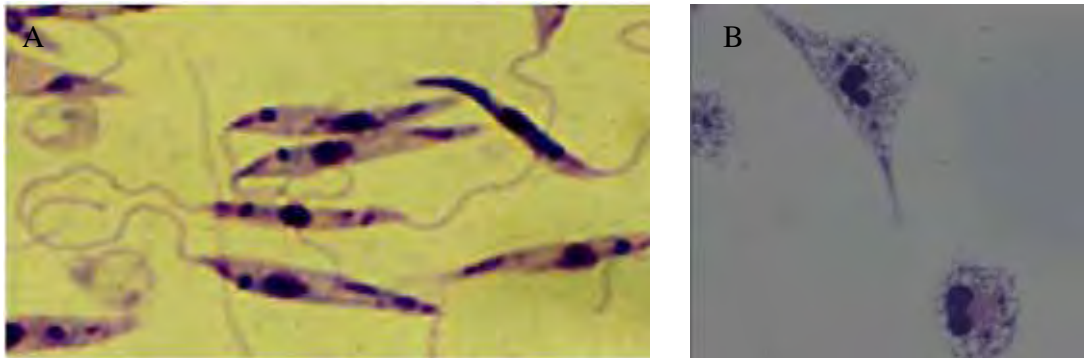


Figura 02 - *Leishmania (L.) amazonensis*, nas formas promastigota em cultura ($\times 1000$; A) e amastigota (B) (Foto doada por: Dra. Márcia Graminha, FCF, UNESP, Araraquara). Os amastigotas estão infectando um macrófago ($\times 1000$) (WHO, 2010).

O vetor pode se infectar ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo macrófagos que possuem amastigotas no seu interior. Após a lise do macrófago infectado as amastigotas transformam-se em promastigotas, as quais aderem as microvilosidades do intestino médio do inseto. Nesta fase, os parasitos são denominados procíclicos, e caracterizam-se por se multiplicarem rapidamente por divisão binária, transformando-se, após alguns dias, em promastigotas metacíclicos, que são muito móveis e não têm a capacidade de se dividir. Os promastigotas metacíclicos, infectantes, migram para a probóscida do inseto e são injetados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (Figura 03) (PETERS *et al.*, 2008).

Os promastigotas inoculados sobrevivem aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro e então infectam os macrófagos. Dentro dos macrófagos forma-se o fagossomo, onde as formas promastigotas metacíclicas sobrevivem e estabelecem as condições favoráveis para a

diferenciação em amastigotas, que se dividem, lisam o macrófago e infectam novas células, repetindo o ciclo (PETERS *et al.*, 2008). A sobrevivência intracelular do parasito pode estar relacionada à rapidez de sua transformação em amastigota (LEWIS, 1974), uma vez que estas formas encontram-se melhor dotadas bioquímica e enzimaticamente para resistirem aos mecanismos microbicidas dos macrófagos (PEARSON *et al.*, 1983).

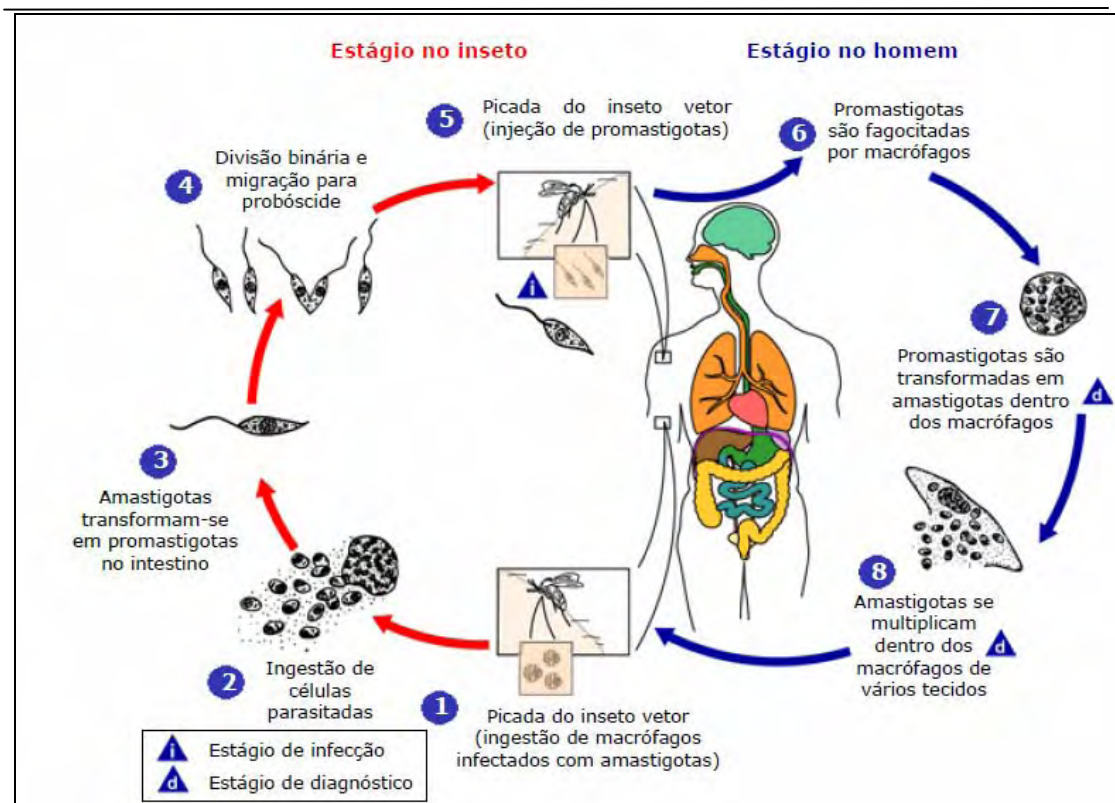


Figura 03 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

2.1.5 Interação parasito-hospedeiro

As formas amastigotas localizadas no interior dos macrófagos são organismos acidófilos, capazes de resistirem à ação microbicida das hidrolases ácidas, liberando lisoenzimas para sobreviver e multiplicar-se por divisão binária, até causar a lise da célula, sendo então fagocitadas novamente por outros macrófagos (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994).

Sobre a infecção do homem e de várias outras espécies de mamíferos por tripanosomatídeos, existe a dependência de complexas interações entre o parasito e o hospedeiro

vertebrado, que determinam a apresentação clínica e o curso evolutivo da doença. Estas interações se realizam entre as formas do ciclo evolutivo do parasito e as células do hospedeiro, havendo uma correlação entre as necessidades nutricionais do parasito e o compartimento em que ele reside (McCONVILLE, 2007).

Recentemente, as proteases dos parasitos vêm recebendo considerável atenção dos pesquisadores (PEREIRA *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012). Este fato levou à análise de sua importância na interação parasito-hospedeiro. Um parasito bem sucedido deve conseguir penetrar e sobreviver no interior do hospedeiro, assimilando os componentes necessários à sua nutrição e conseguindo escapar da resposta imunológica do mesmo (GAZANION *et al.*, 2011). As proteases participam de muitos dos mecanismos que os parasitos utilizam para persistirem no hospedeiro, tornando-se importantes alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos (ALVAREZ, *et al.*, 2012).

2.1.6 A importância das proteases – seu papel nas interações entre parasitos e hospedeiros

Os parasitos garantem sua perpetuação dentro de seus hospedeiros através da produção de muitas moléculas, que ativam mecanismos de sobrevivência, sendo assim estas moléculas são potenciais alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos (MICHELS; AVILÁN, 2011). Entre essas moléculas, as proteases são cruciais no ciclo de vida e patogenicidade, em especial da leishmaniose e doença de Chagas (ROSENTHAL, 1999; SADIJ; MCKERROW, 2002; GAZANION *et al.*, 2011). Estas enzimas têm sido implicadas em uma grande variedade de mecanismos de adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, que incluem modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação do parasito e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação para manter a infecção (COOMBS; MOTTRAM, 1997; SADIJ; MCKERROW, 2002; APARICIO *et al.*, 2004).

Proteases ou peptídeo-hidrolases são enzimas capazes de provocar a quebra de ligações peptídicas, tendo uma ampla distribuição filogenética. Quatro classes de proteases são reconhecidas pela União Internacional e Bioquímica: serino proteases, cisteíno proteases, aspartato proteases e metaloproteases (POWERS, 2002).

As serino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, acompanhado de um resíduo de ácido aspártico e outro de histidina formando uma tríade catalítica. A catálise ocorre via formação de um estado de transição tetraédrico durante as etapas de acilação e desacilação. A tripsina, a quimiotripsina, a elastase, as calicreínas e as oligopeptidases B e C são exemplos de serino proteases (POWERS, 2002; MUNDAY *et al.*, 2011). Pesquisas sobre os efeitos de inibidores de serino proteases na sobrevivência de *Leishmania* têm mostrado que estes reduzem a viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que as serino proteases podem ser utilizadas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos (SILVA-LOPEZ *et al.*, 2007).

As cisteíno proteases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima, que atua de forma semelhante ao resíduo de serina das serino proteases. A catálise ocorre via um intermediário tiol-éster e é facilitada pelos resíduos adjacentes de histidina e ácido aspártico. São exemplos de cisteíno proteases, a papaína, a cruzaina, as catepsinas e as calpaínas, sendo que as principais funções fisiológicas destas moléculas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas, e estas enzimas também estão envolvidas em várias patologias (SEGUNDO, 1993), sendo notoriamente presentes em protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (ALVAREZ *et al.*, 2012).

Nas aspartato proteases existem dois resíduos de ácido aspártico no centro ativo da enzima, um dos quais, na faixa de pH ótimo (em torno de 2 a 3) encontra-se ionizado, enquanto o outro não. São exemplos de proteases pertencentes a esta classe, a pepsina e a renina (FARO, 2004).

As metaloproteases caracterizam-se por possuir um átomo de metal, comumente o zinco, localizado no centro ativo da enzima. O metal é essencial para a catálise, fornecendo uma forte atração eletrofílica para auxiliar o ataque à ligação peptídica de uma molécula de água. A carboxipeptidase e a termolisina são exemplos desta classe de proteases (DeCLERCK, 2000).

As cisteíno proteases são fatores de virulência, representando candidatos para desenvolvimento de medicamentos (PEREIRA *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012) e vacinas sendo extensivamente estudadas em diferentes organismos patogênicos. Estas proteases de parasitos também estão implicadas em muitos processos, incluindo diferenciação, nutrição, infecção da célula hospedeira e fuga da resposta imune do hospedeiro (KLEMBE; GOLDBERG, 2002;

MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; SAJID; MCKERROW, 2002). As cisteíno proteases (CPA e CPB) tipo Catepsina-L têm-se mostrado necessárias para a sobrevivência de *L. (L.) mexicana* dentro de macrófagos *in vitro* (DENISE *et al.*, 2003), uma vez que ela é predominantemente expressa e ativa em amastigotas e menos intensamente em promastigotas metacíclicas (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998). Essa observação, junto com o fato da *Leishmania* não crescer dentro de macrófagos na presença de inibidores de CP, sugerem que as CP são necessárias para o parasitismo intracelular ser bem sucedido (ALVAREZ *et al.*, 2012).

Em estudos recentes têm também sido demonstrados que estas proteases agem ainda como moduladoras da resposta imune do hospedeiro à *L. (L.) mexicana* (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; BUXBAUM *et al.*, 2003). Outros estudos, como os de inibição em *L. (L.) chagasi*, indicam que cisteíno proteases ajudam na infecção e sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos (MUNDODI; KUCKNOOR; GEDAMU, 2005).

A atividade de cisteíno proteases é necessária para a sobrevivência da *L. (L.) mexicana* (COOMBS; BAXTER, 1984; DENISE *et al.*, 2003) e *Trypanosoma cruzi*, *in vitro* (HARTH *et al.*, 1993). Estudos têm confirmado a eficácia de inibidores de cisteíno proteases no tratamento da infecção por *T. cruzi*, *P. falciparum* e *L. (L.) major* (MCKERROW; MCGRATH; ENGEL, 1995; ROSENTHAL, 1987; MAEKAWA *et al.*, 1998).

As proteases têm um papel importante nos mecanismos patogênicos e nos eventos de diferenciação de protozoários parasitas. O papel principal da atividade proteolítica de proteases na regulação da homeostase celular foi muito bem descrito em várias espécies de leveduras e eucariotos superiores, como também no tripanosoma africano, *T. brucei* (HUA *et al.*, 1996; TO; WANG, 1997).

Algumas modificações que ocorrem durante o ciclo de vida dos protozoários podem estar condicionadas à presença de proteases. Isto porque uma característica marcante do ciclo de vida dos protozoários parasitas é o profundo remodelamento morfológico que eles sofrem durante o seu desenvolvimento nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Algumas das mudanças mais marcantes ocorrem quando os parasitas deslocam-se de um meio extracelular para um meio intracelular. Todas estas mudanças morfológicas envolvem a reestruturação de organelas, como flagelos e cinetoplastos; e o rearranjo do citoesqueleto para acomodar as variações de forma (GONZALES *et al.*, 1999).

O papel das proteases no remodelamento de protozoários parasitos foi descrito em *T. cruzi*. Foi demonstrado que a lactacistina inibe a transformação de tripomastigotas em amastigotas e também o desenvolvimento de amastigotas em tripomastigotas. Em relação a infectividade dos parasitos, estes autores demonstraram que a lactacistina não afeta a invasão de mioblastos por tripomastigotas; entretanto, o desenvolvimento intracelular dos parasitos é inibido (GONZALEZ *et al.*, 1996).

A cruzaina (EAKIN *et al.*, 1992), também conhecida como cruzapaina ou GP57/51 (MURTA *et al.*, 1990) é a CP melhor caracterizada em *T. cruzi* (CAZZULO *et al.*, 1990). A enzima é expressa como uma mistura de isoformas e foi primeiramente relatada em extratos de epimastigotas por Itow e Camargo (1977) e posteriormente purificada (BONTEMPI *et al.*, 1984).

A cruzaina é expressa em vários estágios do parasito (SOARES *et al.*, 1992). Algumas isoformas são secretadas para o ambiente por tripomastigotas, sendo este um papel relevante da cruzaina como fator de virulência na Doença de Chagas (YOKOYAMA-YASUNAKA *et al.*, 1994; APARÍCIO *et al.*, 2004).

A cruzaina é também capaz de induzir a produção de peptídeos pró-inflamatórios (DEL NERY *et al.*, 1997), sendo proposta como um fator de virulência na Doença de Chagas (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000), a cruzaina pode, ainda, prover um mecanismo pelo qual o parasito pode escapar da resposta imune do hospedeiro (BERASAIN *et al.*, 2003).

Além disso, o bloqueio da invasão em muitos parasitos, incluindo *Plasmodium falciparum* (ROGGWILLE *et al.*, 1996) e *Toxoplasma gondii* (CONSEIL; SOETE; DUBREMETZ, 1999) tem sido observado devido ao uso de inibidores específicos de serino proteases.

A importância da proteólise intracelular em protozoários do gênero *Leishmania* foi até hoje demonstrada apenas na espécie *L. (L.) mexicana*. Robertson (1999) observou a inibição do crescimento *in vitro* de promastigotas e amastigotas após tratamento com inibidores de proteases. Durante seu desenvolvimento no hospedeiro, a *Leishmania* e o *T. cruzi* liberam antígenos em seu ambiente, especialmente proteínas que têm sido consideradas como fatores de virulência (CHANG *et al.*, 2003; APARÍCIO *et al.*, 2004).

As proteases extracelulares do parasito têm um papel crucial no seu ciclo de vida e na patogenia causada por ele (MCKERROW *et al.*, 1993). Elas têm sido associadas a uma ampla variedade de mecanismos de adaptação, para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, que além

da modulação da resposta do sistema imune, incluem a invasão e destruição de tecidos, capacidade do parasito migrar para locais específicos para o crescimento e desenvolvimento e/ou adquirir nutrientes essenciais que garantem a sobrevivência e proliferação para manutenção da infecção (COOMBS; MOTTRAM, 1997; ROSENTHAL, 1999; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002).

É sabido, ainda, que oligopeptidases B e C estão envolvidas na penetração de formas tripomastigotas em células de mamíferos por desencadearem mecanismos de sinalização de Ca^{2+} (BURLEIGH *et al.*, 1997). É possível, por conseguinte, que estas oligopeptidases processem proteínas parasitárias responsáveis pela sinalização celular do Ca^{2+} em células de mamíferos, necessárias para a penetração do parasito (HERMELY *et al.*, 2003), o que faz delas importante alvo terapêutico no desenvolvimento de novas substâncias antiparasitárias.

A descrição de proteases em protozoários, principalmente em protozoários parasitos, em particular no *T. cruzi*, e a sugestão da sua participação em processos celulares essenciais para o estabelecimento desses parasitos em seus hospedeiros, levaram-nos à hipótese de semelhante importância em um outro tripanosomatídeo, a *L. (L.) amazonensis*. Assim, nos propusemos a determinar a capacidade inibitória sobre proteases oriundas de *Leishmania* e de *T. cruzi* como um possível alvo terapêutico das substâncias químicas avaliadas neste estudo, especialmente considerando a grande porcentagem de cisteíno proteases conhecidamente presentes em parasitos dos gêneros *Leishmania* e *T. cruzi*, e a fundamental importância destas para a sobrevivência e virulência do parasito (COOMBS; MOTTRAM, 1997, ALVAREZ *et al.*, 2012), este grupo de proteases representou um importante alvo no desenvolvimento deste trabalho.

2.1.6.1 Cisteíno proteases do gênero *Leishmania*

Diferentes tipos de proteases são expressas nos vários estágios do ciclo de vida de protozoários parasitas e estão envolvidas na sua replicação e metamorfose (ALVAREZ *et al.*, 2012). No caso do gênero *Leishmania*, as proteases melhor estudadas são três isoformas de cisteíno proteases, denominadas CPA e CPB, que são enzimas do tipo Catepsina-L (MOTTRAM *et al.*, 2004) e CPC, que é uma enzima do tipo Catepsina-B (BART *et al.*, 1995). Essas três enzimas são do tipo papaína e pertencem ao mesmo grupo de CPs (MOTTRAM *et al.*, 1998). As

enzimas do tipo CPB são encontradas nos megassomos (lisossomos largos), nos vacúolos parasitóforos e extracelularmente nas lesões, dando a estas enzimas a oportunidade de interagirem com as proteínas do hospedeiro (ILG *et al.*, 1994).

Estas CP's são pouco expressas nas formas procíclicas, expressas nas formas metacíclicas e principalmente nas formas amastigotas do parasito (SOUZA *et al.*, 1992). Elas são importantes fatores de virulência que modulam a resposta imune do hospedeiro e parecem possuir um papel vital na sobrevivência do parasito nos macrófagos (MOTTRAM *et al.*, 2004).

2.1.7 Tratamentos

O antimônio foi introduzido na terapêutica médica no século XV, empregado para diversas afecções. Sua toxicidade e ineficácia em muitos pacientes fizeram com que seu uso fosse proibido. Em 1630, o sal de antimônio trivalente, denominado emético, foi introduzido na medicina. Sua utilização foi novamente abandonada nos séculos XVIII e XIX, até que, em 1907, foi relatada a atividade do tártaro emético contra tripanossomas africanos. Em 1912 foram publicados os resultados obtidos por Vianna no tratamento da úlcera de Bauru e, cerca de três anos depois, o tártaro emético já estava sendo amplamente empregado no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, sendo responsável pela redução da mortalidade dessa doença, de cerca de 90 para 5% dos pacientes (BRYCESON, 2000).

Os antimoniais trivalentes, extremamente tóxicos, foram, a partir de 1920, substituídos pelos antimoniais pentavalentes e, a partir dos anos 40, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumine passaram a representar os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, não estando seu mecanismo de ação, até o momento, esclarecido (CROFT; YARDLEY, 2002).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{V}) são administrados por via parenteral. No interior do macrófago, são convertidos em antimoniais trivalentes (Sb^{III}), compostos mais tóxicos contra os dois estágios de *Leishmania* (FREZARD *et al.*, 2001) e também para o homem.

Estas substâncias induzem uma variedade de efeitos adversos (alguns deles bem graves) tais como: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, dor abdominal, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitações, insônia, nervosismo, insuficiência renal, arritmias,

anemia e tosse (RAVDIN, 1990; KHAW; PANOSIAN, 1995). Outros efeitos como supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e pancreatite química também podem ocorrer (HEPBURN, 2000). A eficácia destas substâncias é variável devido à dosagem baixa e descontínua, sendo as causas de maior importância no número de recaídas e resistência de *Leishmania* (SUNDAR *et al.*, 2001).

A anfotericina B é uma substância de segunda escolha, sendo altamente efetiva no tratamento das leishmanioses resistentes aos antimoniais (BERN *et al.*, 2006). O metabolismo dos esteróis em *Leishmania* é particular, sendo o ergosterol o mais importante esterol de membrana neste parasito, o que o diferencia da célula hospedeira, onde o colesterol é o componente esterol predominante na membrana plasmática. O macrolídeo anfotericina B tem alta afinidade por episterol, que é um precursor do ergosterol (SINGH; PANDEY; SUNDAR, 2006), o que leva a uma alteração na composição da membrana, produzindo poros e alterando a permeabilidade, causando o escape de íons e, portanto, morte do parasito (BALANA-FOUCE, 1998).

A anfotericina B é administrada por via endovenosa, sendo seu uso limitado devido à sua toxicidade, apresentando efeitos como anafilaxia, trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, disfunção renal, entre outros (LANIADO-LABORIN; VERGAS, 2009). Novas formulações de anfotericina B associada a lipídeos conferem propriedades peculiares resultando na preferencial sensibilidade a macrófagos infectados por *Leishmania* além de apresentarem grande redução da toxicidade (BERN *et al.*, 2006).

A pentamidina é uma diamina aromática que pode ser usada em casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais (SINGH *et al.*, 2012). Tem sido aplicada no Brasil, principalmente, para o tratamento de infecções por *L. (V.) guyanensis*, que geralmente respondem mal ao tratamento com antimoniais. Seu mecanismo de ação não está bem definido, mas parece ocorrer inibição da síntese das poliaminas arginina, petruscina e espermidina (BRAY *et al.*, 2003). Esta substância também pode atuar como intercalante de DNA do cinetoplasto, interferindo na replicação, transcrição, ou ambas (BASSELIN *et al.*, 2002). Estudos recentes têm demonstrado também sua ação sobre o potencial de membrana (VERCESI; DOCAMPO, 1992; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Esta diamina pode ser administrada por via endovenosa, e com frequência produz efeitos adversos como taquicardia, hipotensão, dor de cabeça, vômitos, náuseas, erupção cutânea, disfunção renal e outros como hipoglicemia ou hiperglicemia (COELHO *et al.*, 2007).

A paromomicina é um antibiótico da família dos aminoglicosídeos que, além da aplicação parenteral, vem sendo avaliada por via tópica em leishmaniose cutânea (SUNDAR *et al.*, 2007). Atua inibindo a atividade mitocondrial da *Leishmania*, com a perda do potencial de membrana e respiração, através da inibição no abastecimento de substratos para o metabolismo da mitocôndria. Existem também evidências de que este antibiótico altere a captação de precursores de macromoléculas dificultando o crescimento do parasito. E de que altere a composição de lipídeos na membrana, provocando diminuição na fluidez (LIMA *et al.*, 2007).

O miltefosine é um derivado alquil-lisofosfolípídico, com atividade antiproliferativa, que foi inicialmente testado por suas propriedades anti-tumorais. Recentemente, começou a ser utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral, constituindo-se no primeiro medicamento bem sucedida por via oral (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Esta substância está sendo avaliada em diferentes partes do mundo. Os testes realizados na Índia indicaram boa atividade contra leishmaniose visceral, com eficácia de 95% (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). A atividade do miltefosine contra *Leishmania* está relacionada à alteração da composição da membrana, com redução do conteúdo de fosfatidilcolina e ergosterol, entretanto, não apresenta eficácia nas espécies mais frequentes no Brasil (RAKOTOMANGA *et al.*, 2007).

As reações adversas mais frequentes, relacionadas ao uso de miltefosine são distúrbios gastrintestinais transitórios como vômitos e diarreia. A maior limitação ao seu uso até o momento está relacionada aos efeitos teratogênicos (BHATTACHARYA *et al.*, 2004).

Um outro grupo de substâncias em estudo na atualidade é representado por bifosfonatos, como residronato e pamidronato. Estes compostos parecem interferir na síntese de farnesil pirofosfato e geranyl pirofosfato, que são metabólitos chave para a isoprenilação de proteínas (MARTIN *et al.*, 2001). São compostos com atividade leishmanicida, mas também apresentam alta toxicidade (RODRIGUES *et al.*, 2002).

A atividade leishmanicida foi também demonstrada para compostos azólicos, tais como cetoconazol e itraconazol (BERMAN *et al.*, 1986; URBINA, 1997), mas testes clínicos revelaram ineficácia no tratamento de leishmaniose humana (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Moléculas das classes das benzofenonas e biflavonóides, oriundas de produtos naturais, vêm mostrando promissora atividade leishmanicida, aparentemente por inibição de cisteíno proteases do parasito, representando também uma alternativa terapêutica no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (PEREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011).

2.1.7.1 Resistência ao tratamento

Durante mais de 70 anos, apesar de sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como medicamentos de primeira escolha para tratar leishmanioses cutânea e visceral. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paromomicina e miltefosine são substâncias de interesse por representarem novas alternativas de tratamento contra esta doença, no entanto, problemas com efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação, seguem sendo os grandes desafios (MEHEUS *et al.*, 2010).

Além da toxicidade que possuem os medicamentos anti-*Leishmania*, outro grave problema que dificulta o tratamento da doença recai no desenvolvimento de resistência pelo parasito (KAYE; SCOTT, 2011). Temos assim, que o uso de antimoniais como primeira linha de tratamento em muitas partes do mundo está ameaçado, dado o desenvolvimento de resistência nos últimos 15 anos. Recentemente, estudos demonstraram que na Índia quase 80% dos parasitos isolados são resistentes aos antimoniais (SUNDAR *et al.*, 2001). Um dos mecanismos de resistência induzida aos antimoniais já identificados é a amplificação do gene que codifica um transportador responsável pela extrusão do medicamento (HAIMEUR; OUELLETTE, 1998). Outros mecanismos, entretanto, parecem estar associados à resistência natural (SINGH; SINGH; SUNDAR, 2003).

No caso dos medicamentos de segunda escolha, como a anfotericina B e a pentamidina, não parece que a resistência seja um limitante para seu uso clínico (PEREZ VICTORIA *et al.*, 2006). Até o momento, não existem registros de resistência aos compostos ainda em fase de avaliação para o tratamento de leishmaniose como paromomicina, azóis e bifosfonatos, possivelmente devido a seu uso limitado até então.

A leishmaniose é uma doença tropical que vem sendo tratado com medicamentos não leishmanicidas, não sendo o mecanismo exato destas substâncias claramente conhecido.

Publicações recentes, em pesquisas com *Leishmania*, revelam que o foco vem sendo dado a triagens de substâncias e terapias combinatórias de medicamentos não leishmanicidas disponíveis, e pouca ênfase vem sendo dada a outros aspectos, como a biologia do parasito. Pesquisas por novas potenciais substâncias, focando principalmente alvos bioquímicos e rotas metabólicas essenciais para a sobrevivência do parasito fazem-se necessárias (SINGH *et al.*, 2012).

Neste contexto, a busca por compostos ativos, que possam dar origem a novos medicamentos anti-*Leishmania* apresenta-se como uma necessidade urgente, dada a ineficácia dos tratamentos atuais, sua alta toxicidade e o aparecimento cada vez mais comum de cepas resistentes às terapias convencionais. Assim, substâncias químicas provenientes de recursos naturais representam uma grande fonte de compostos, os mais variáveis possíveis, que merecem ser investigados quanto as suas atividades biológicas, na esperança da obtenção de uma entidade química mais eficaz para o tratamento das leishmanioses e menos tóxica para o hospedeiro humano.

2.2 Radicais derivados de oxigênio e nitrogênio e sua importância para regular o parasitismo

O controle do crescimento intracelular da *Leishmania* em macrófagos ativados de camundongos depende fundamentalmente da ação de óxido nítrico (NO), sintetizado a partir de L-arginina pela ação de uma NO-síntase (iNOS) induzível por citocinas ativadoras como interferons do tipo IFN- γ e também do tipo I e TNF- α (LIEW; O'DONNELL, 1993).

Os radicais intermediários de oxigênio e nitrogênio foram eficientes no controle da infecção de macrófagos murinos por *L. (L.) donovani*, mostrando eficiente efeito leishmanicida mesmo para a espécie de *Leishmania* que pode determinar a doença visceral (MURRAY; NATHAN, 1999). A produção de NO também desempenha papel importante no controle, e são relativamente muito reduzidos da fase inicial da leishmaniose cutânea murina causada por *L. (L.) mexicana* (DIAZ *et al.*, 2003).

Entretanto, na espécie humana os níveis de produção de NO por macrófagos ativados são relativamente muito reduzidos em comparação aos encontrados nos camundongos, embora haja

expressão de mRNA para iNOS após estimulação por IFN- γ . O controle da infecção intracelular por leishmania em macrófagos humanos ativados por citocinas parece depender da geração de radicais de oxigênio e nitrogênio de mecanismos independentes de oxigênio (MURRAY; TEITELBAUM, 1992). Todavia, outros autores descrevem ação parasiticida, aparentemente mediada por NO, exercida por macrófagos humanos sobre várias espécies de *Leishmania* (PANARO *et al.*, 1999).

2.2.1 Radicais Livres

O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente (VANNUCCHI *et al.*, 1999).

A presença de um ou mais elétrons não pareados determina uma atração para um campo magnético e, algumas vezes, torna a substância altamente reativa. Radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de uma substância não radical. Eles podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada e um elétron de cada um dos pares permanece em cada átomo, em processo chamado fissão homolítica. A energia necessária para dissociar a ligação covalente pode ser fornecida pelo calor, radiação eletromagnética ou outras fontes. A grande maioria dos radicais livres possui como característica uma meia-vida muito curta, indo de minutos a nanossegundos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas (VANNUCCHI *et al.*, 1999), podendo ser úteis no combate a parasitoses intracelulares, afetando a membrana do parasito.

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, interferir na saúde humana. Ocorrendo na membrana, a oxidação de lipídeos interfere no transporte passivo e ativo normal através desta, ou ocasiona a ruptura dessas levando a morte celular (BARREIROS *et al.*, 2006).

Para evitar os danos causados pelos radicais livres, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados

antioxidantes. Quando esta equivalência não existe, dizemos que está ocorrendo um estresse oxidativo (VANNUCCHI *et al.*, 1999).

2.2.2 Antioxidantes

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (**EROs**) ou espécies reativas de nitrogênio (**ERNs**) (BARREIROS *et al.*, 2006). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS *et al.*, 2006), ou ainda limitante da patologia, no caso das tripanossomíases (PANARO *et al.*, 1999).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell *et al.* (2000) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os antioxidantes produzidos pelo organismo humano podem agir enzimaticamente ou não enzimaticamente e, além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e dímeros de flavonóides (BARREIROS *et al.*, 2006).

2.3 Plantas Medicinais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS *et al.*, 2006).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. A variedade e a complexidade das macromoléculas que constituem os metabólitos secundários das plantas e organismos marinhos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI *et al.*, 2001).

A utilização das plantas como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga. Além disso, devido ao elevado custo de muitos medicamentos, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna, tem se utilizado dos produtos naturais para o tratamento de suas enfermidades. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 65% a 80% da população mundial (KEDZIERSKI, 2010) (estimada em 9,0 bilhões de pessoas) não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina popular, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio para muitas doenças (SIMÕES *et al.*, 2003; CALIXTO, 2003).

2.3.1 Plantas do Cerrado como fonte de moléculas bioativas: gênero *Arrabidaea*

O Cerrado brasileiro apresenta cerca de 6500 espécies vegetais das quais a mais de duzentas já se têm atribuído alguma importância econômica. A complexidade vegetal e

diversidade de fisionomias propiciam variações na população vegetal deste bioma, aumentando as expressões fenotípicas devido à influência dos componentes ambientais. Esta variação é muito importante por tornar os vegetais aptos a sobreviverem quando submetidos a fortes pressões seletivas, o que os torna ricos em metabólitos secundários (BRASIL, 2004).

Uma importante família de plantas, típica do Cerrado, é a Bignoniaceae, constituída por cerca de 120 gêneros e 800 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais da América do Sul e África (POSER *et al.*, 2000). Entre estes gêneros destaca-se o gênero *Arrabidaea*, constituído por cerca de 70 espécies, as quais recebem os nomes populares de: Mato Queimado, Cipó Una, Santo Cipó, Puçá Panga e Pariri (BARROSO, 1986).

As espécies de Bignoniaceae são encontradas em diferentes tipos de ambientes, desde os cerrados abertos até as florestas úmidas e perenifólias, representando a principal família de lianas das matas brasileiras. As espécies deste táxon encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo freqüentemente encontrados no continente americano, sul do México, cujos jacarandás (*Jacaranda brasiliana*) e ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *Tabebuia avellaneda*) são os exemplos mais representativos da família (LORENZI, 1988).

Bignoniáceas são muito utilizadas na construção civil, carpintaria e construção de instrumentos musicais devido à natureza rígida da madeira; em planejamento urbano é também usada como planta ornamental, devido à beleza de suas florações, que têm no ipê o exemplo mais conhecido no paisagismo urbano (BOLZANI *et al.*, 2003). Muitas espécies têm sido também usadas como remédios para diversas finalidades (BOLZANI *et al.*, 2003).

Constituintes químicos reconhecidos na família são naftoquinonas do tipo lapachona, alcalóides, flavonas, triterpenos, polifenóis, taninos e óleos de sementes. Lapachol e β -lapachona, encontrados em espécies de *Tabebuia*, tem apresentado inúmeras atividades bio-farmacológicas, incluindo anti-inflamatórias, anti-microbiana, anti-fúngicas, anti-virais, anti-parasitárias, anti-protozoários e anti-câncer (MILTON *et al.*, 2003).

Existem poucos relatos de estudos químicos relacionados ao gênero *Arrabidaea*, entretanto, da *A. chica* já foram isolados fitosteróis, flavonóides (BARBOSA *et al.*, 2008) e pigmentos utilizados em cosméticos, como carajurona, carajurina e 3-deoxiantocianidinas (ZORN *et al.*, 2001; ALCERITO *et al.*, 2002). Esta era também utilizada pelos índios no preparo de pigmentos vermelhos, e na cultura popular suas folhas são usadas como agentes anti-inflamatório

e adstringente, assim como para cólicas intestinais, diarreia sanguinolenta, leucorréia, anemia e leucemia (COSTA; LIMA, 1989). O extrato etanólico de *A. chica* apresentou, ainda, atividade tripanocida e antifúngica, como descrito por Barbosa *et al.* (2008), e o metanólico apresentou atividade estimulante sobre o crescimento de fibroblastos e produção de colágeno, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (JORGE *et al.*, 2008), dessa forma, a *A. chica* representa a espécie do gênero mais estudada até o momento.

Alguns trabalhos destacam espécies como *A. samydoides*, *A. triplinervia*, *A. patellifera* e *A. brachypoda*, por suas utilizações populares como cicatrizante, anti-séptico, tratamento de cólicas intestinais, diarreia e entero-colites diurética sendo que estudos fitoquímicos e farmacológicos com estas espécies comprovaram também propriedades antifúngica (ALCERITO *et al.*, 2002), antimalárica (PAULETTI *et al.*, 2003) e antitumoral (BOLZANI *et al.*, 2003) em extratos e compostos isolados, o que demonstra o potencial bio-farmacológico deste gênero vegetal.

O extrato metanólico de *A. samydoides* apresentou boa atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum* (MARTIN *et al.*, 2008), e dela foram isoladas xantonas com atividade antioxidante (PAULETTI *et al.*, 2003) e também o composto mangiferina (MARTIN *et al.*, 2008).

O extrato etanólico das folhas de *A. triplinervia* mostrou atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi* (LEITE *et al.*, 2006).

Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre a quimiotaxonomia e atividades biológicas atribuídas a esse gênero. Atualmente cerca de 06 espécies vem sendo estudadas e relatadas como fontes ricas em derivados fenólicos e triterpênicos, descritos como substâncias responsáveis pela atividade atribuída na medicina tradicional para algumas dessas espécies.

2.3.2 Aspectos econômicos e ecológicos do gênero *Arrabidaea*

Nos últimos anos, o Cerrado, que se estende por 356.630 km² da vegetação remanescente, ou seja, 20% de sua área original, foi submetido a um processo de fragmentação causada pela expansão das fronteiras agrícolas e, conseqüentemente, um aumento de áreas utilizadas para agricultura e pecuária. Essa expansão levou à fragmentação de habitat para diversas espécies,

levando o Cerrado a ser considerado recentemente um dos 25 líderes do mundo "hotspots" para a preservação da biodiversidade, onde estratégias de preservação são de fundamental importância (MYERS *et al.*, 2000).

A flora do cerrado é de enorme riqueza, mas somente 1,5% de sua extensão é protegida por lei. Em vista disto, é preciso valorizar os recursos que ela oferece e que estão sob forte pressão de extinção, como as espécies medicinais (GUARIM NETO; MORAES, 2003).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo, e as plantas, desde os tempos antigos, têm sido usadas para tratar uma grande quantidade de doenças, incluindo câncer (AGOSTINI *et al.*, 2005). Muitos compostos com atividades biológicas foram obtidos do Cerrado, segundo maior bioma do Brasil (FERREIRA *et al.*, 2007).

A busca de novos medicamentos que exibem atividade contra vários tipos de patologias é um dos assuntos mais interessantes no campo de pesquisa de produtos naturais. Embora as estimativas de riqueza variem enormemente, o universo das espécies conhecidas para os principais grupos taxonômicos já é suficiente para colocar o país no primeiro lugar mundial em termos de espécies. Além do tamanho, o isolamento geográfico observado no passado remoto e a grande variação de ecossistemas seriam as razões que explicam tal diversidade (SANO *et al.*, 2008).

Considerando a importância do cerrado como fonte na busca alternativa por tratamento de várias patologias e o rápido ritmo de desmatamento desse bioma que atingiu cerca de 15% nas últimas décadas do século XX (SANO *et al.*, 2008), a necessidade de estudo e revisão da situação atual do gênero *Arrabidaea* faz-se urgente.

2.3.3 *Arrabidaea brachypoda* Bureau

A *Arrabidaea brachypoda* (Figura 04) é uma planta nativa do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como "cipó-una" ou "tintureiro", possui arbustos escandecentes de até 70 cm, ramos cilíndricos, estriados glabros, com lentículas. Pseudo-estípulas ausentes. Folhas 1-2-folioladas; folíolos de 8-10 x 4-5 cm, oblongos a obovados, coníceos, concolores, ápice acuminado e acuminado arredondado, algumas vezes mucronulado, margem inteira, plana, base cuneada, nervação palminérvia, faces adaxial e abaxial glabras; pecíolos de 1,5-2,0 cm; gavinhas simples. Inflorescência em tirso; eixo da inflorescência glabro. Epicálise ausente; cálice dentado,

glabro, corola rósea a roxa, com faixas brancas inteiramente; infundibuliforme, densamente tomentosa; estames inclusos, antenas glabras, estaminódio reduzido, glabro; disco nectarífero conspícuo e sementes ala membranáceas (TOPAA, 1998).



Figura 04 – Fotos de *A. brachypoda*. Fonte: (<http://www.tropicos.org/Image/15239>
<http://www.tropicos.org/Image/15226>)

Em 2002, Alcerito e colaboradores relataram estudos sobre atividade antifúngica. As folhas de *A. brachypoda* foram analisadas visando o conteúdo de flavonóides e 04 compostos foram isolados. Eles são flavonóides conhecidos e demonstraram atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*. Os mesmos foram caracterizados (Figura 05) como 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**A**), cirsiol (**B**), cirsimaritina (**C**) e hispidulina (**D**). Dois atributos principais resultantes desse trabalho foram o relato do composto 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona como um produto natural e também a primeira vez que o cirsiol foi encontrado em Bignoniaceae.

Em estudo recente (ROCHA *et al.*, 2011), o extrato etanólico de *A. brachypoda* apresentou também atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva, confirmando o potencial biofarmacológico desta espécie.

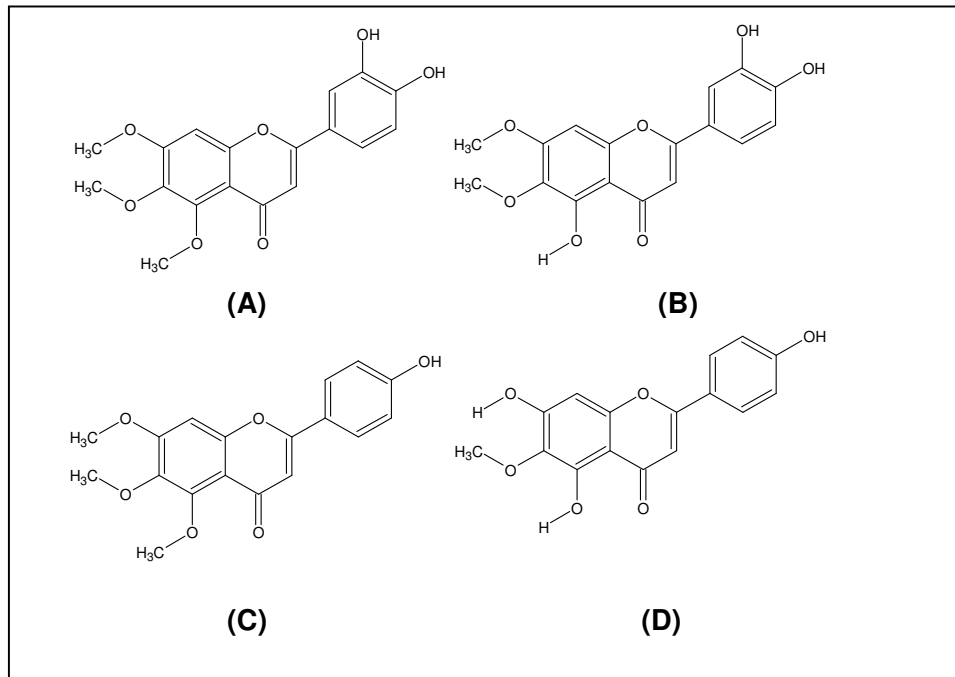


Figura 05 – Estrutura química dos compostos 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (A), cirsiol (B), cirsimaritina (C) e hispidulina (D), isolados de *A. brachypoda*.

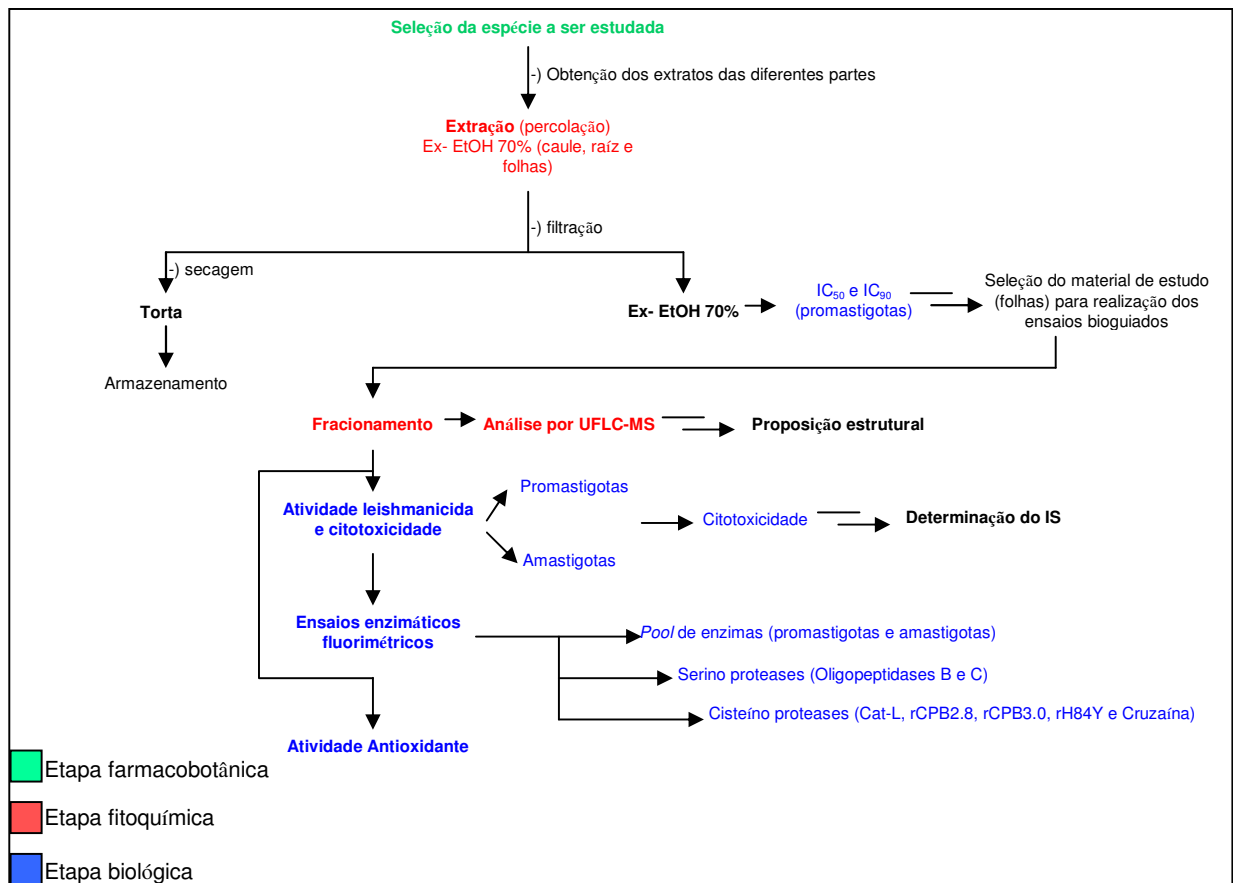
Assim, apesar da ampla utilização popular deste gênero, muito pouco ainda é sabido a respeito da constituição química e dos potenciais farmacológicos deste, sobretudo desta espécie. A ausência de estudos químicos sobre o gênero em questão, aliada ao fato da importância do registro químico de espécies endêmicas dos biomas brasileiros, juntamente com a necessidade da busca por novas entidades químicas com potencial antiparasitário motivaram o presente trabalho.

3 OBJETIVOS

- Obter extratos e frações de *A. brachypoda* e avaliá-los quanto a atividade leishmanicida, anti-proteolítica e anti-oxidante;
- Estudar quimicamente o extrato bruto e suas frações, através de cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UFLC) e UFLC acoplado a espectrometria de massas (UFLC-EM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de Trabalho



4.2 Execução do Plano de Trabalho

- ✓ Os testes de atividade antioxidante *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicina, Departamento Farmácia - UNIFAL-MG. Foi utilizado espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu-2550), de feixe duplo. O extrato e frações foram solubilizados em etanol e analisados no $\lambda = 517$ nm.
- ✓ A partição do extrato bruto também foi realizada no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicina, Departamento Farmácia - UNIFAL-MG.

- ✓ Os testes antiparasitários *in vitro* (ensaios com promastigotas, amastigotas e de citotoxicidade) foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular de Microorganismos e de Parasitologia no Departamento de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG.
- ✓ Nos testes enzimáticos (*pool* e oligopeptidases) foi utilizado espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) no Laboratório de Biofísica da UNIFESP-SP sob colaboração da Prof. Dra. Maria Aparecida Juliano e do doutorando Diego Magno Assis. Realizaram-se também ensaios em Catepsina-L, CPB's e cruzaína no Centro Interdisciplinar de Investigação (CIIB) da Universidade de Mogi da Cruzes sob orientação do professor Dr. Wagner Alves de Souza Judice.
- ✓ As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Biofísica da UNIFESP-SP sob colaboração dos Profs. Dra. Maria Aparecida Juliano, Dr. Luís Juliano e do doutorando Diego Magno Assis. Os extratos foram analisados utilizando-se cromatógrafo líquido LC-20AD (Shimadzu, Tokyo, Japão). A massa molecular de cada produto foi também determinado por UFLC-EM utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão), o qual foi conectado ao circuito UFLC após o detector de UV SPD-20A a 220 e 272 nm, sendo a proposição estrutural realizada em colaboração com o professor Dr. Wagner Vilegas e a doutoranda Cláudia Quintino da Rocha, do Instituto de Química da Unesp-Araraquara.

4.3 Preparo do material para realização dos ensaios

4.3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado constou de folhas, caules e raízes de *A. brachypoda* colhidas em abril de 2008 na cidade de João Pinheiro, Estado de Minas Gerais, Brasil. Os exemplares botânicos foram identificados pela professora Dr^a. Ana Maria Cristina Teixeira Braga, do

Departamento de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto, estando depositado no Herbarium da Universidade Federal de Ouro Preto sob o número 17935.

As partes da planta utilizadas neste estudo para obtenção dos extratos brutos (hidro-etanólicos) foram cedidas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química da Unesp-Araraquara, na pessoa de Cláudia Quintino da Rocha, sua orientanda de Doutorado.

4.3.2 Modelos biológicos

Para realização dos testes *in vitro* utilizou-se protozoários da espécie *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), macrófagos peritoniais murinos, oligopeptidases B e C, Catepsina-L, enzimas recombinantes rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y e a enzima cruzaína. Aprovado pelo CEUA da Unifal sob o registro número 394/2012.

4.3.3 Preparo dos extratos

As partes da planta, após identificação, foram secas em estufa de circulação de ar a 37°C e trituradas. O extrato bruto foi obtido por percolação em solução hidro-alcoólica na proporção 3:7 (v/v), concentrado em evaporador e posteriormente liofilizado (CHRIST, Beta 2-16), obtendo-se o extrato bruto seco que foi utilizado nas avaliações e na obtenção das frações hexânica, acetato etílico, butanólica e aquosa (extrato obtido das folhas), nesta seqüência, por partição líquido-líquido, respeitando-se o aumento de polaridade.

O extrato hidro-etanólico (bruto), seco, foi ressuspendido em 98,5 mL de água + 1,5 mL de etanol, a solução foi então fracionado obtendo-se quatro novas frações, de acordo com suas polaridades crescentes, por partição líquido-líquido, sendo feitas três lavagens do extrato bruto com cada solvente (hexano, acetato de etila e n-butanol), nas proporções de 10:4, 10:3 e 10:3 (dez partes do extrato bruto para quatro, três e três partes de cada um dos solventes, seqüencialmente) (Figura 07), após a lavagem com os três solventes, a fração aquosa remanescente foi liofilizada para obtenção da fração aquosa seca, e cada uma das frações obtidas com os solventes, secas em

evaporador rotatório para obtenção de seus respectivos extratos secos, avaliando-se seus rendimentos.

4.4 Análise cromatográfica / Espectrometria de massas

Os extratos foram analisados utilizando-se cromatógrafo líquido LC-20AD (Shimadzu, Tóquio, Japão). A massa molecular de cada substância foi também determinada por UFLC-EM utilizando LCMS-2020EV equipado com ESI-probe (Shimadzu), o qual foi conectado ao circuito UFLC após o detector de UV SPD-20A a 220 e 272 nm. As condições do UFLC foram: coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 µm) que foi eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C.

4.5 Ensaios *in vitro*

4.5.1 Avaliação da atividade leishmanicida (promastigotas)

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram mantidas em meio Schineider suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas à razão de 1×10^6 células/mL para placas de 24 poços, onde então foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas na faixa de concentração de 0,05 a 100µg/mL. Após 72 horas de incubação a 25°C, os protozoários foram contados em câmara de Neubauer para a determinação do IC₅₀, tendo como controle protozoários em meio de cultura sem a adição de drogas. Este IC₅₀ foi então comparado ao IC₅₀ do medicamento padrão anfotericina B (PEREIRA *et al.*, 2010).

4.5.2 Avaliação da atividade leishmanicida (amastigotas)

Macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos, sendo estes sacrificados por deslocamento da coluna cervical, e as células contadas em câmara de Neubauer.

Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, a 37°C em 5% CO₂. As células foram cultivadas sobre lâminas de vidro de 13mm (Nunc, USA) em placas de 24 poços a uma concentração de 8x10⁵ células por poço, e colocadas em contato com promastigotas na fase lag de crescimento para infecção a uma razão de 10:1 (*Leishmania*/macrófago), sob incubação a 37°C em 5% CO₂ durante 16–18 horas. Os promastigotas não fagocitados foram removidos por lavagem, e as diluições das substâncias a serem avaliadas (nas concentrações de 0,05 a 100µg/mL) foram adicionadas ao meio, solubilizadas em DMSO a uma concentração final de 0,6% v/v. Após 72 horas, as lâminas de vidro foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa a 10% e examinadas por microscopia óptica com uso de óleo de imersão. Um mínimo de 200 macrófagos foram contados por lâmina para cálculo da porcentagem de macrófagos infectados. O percentual de infecção foi calculado em relação ao controle apenas com DMSO para a determinação dos valores de IC₅₀. Todos os testes foram realizados em triplicata e a Anfotericina B (Eurofarma) foi utilizada como substância de referência (PEREIRA *et al.*, 2010).

4.5.3 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO₂, dispostos em placas de 24 poços na razão de 8x10⁵ células por poço, aos quais foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas em várias concentrações (0,1 a 160,0 µg/mL), dissolvidas em DMSO, a uma concentração final de 0,6%, e incubados por 72 horas. Após o período de incubação foi adicionado 50µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) na concentração de 5mg/mL a cada poço, com nova incubação por 4 horas, então o meio de cultura foi removido e adicionou-se 100µL de DMSO a cada poço para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas por 15 minutos e a absorbância de cada amostra avaliada em leitor de ELISA a 560nm (PEREIRA *et al.*, 2010).

A absorbância obtida da amostra controle, tratada apenas com o solvente utilizado para dissolver as substâncias, na mesma concentração (DMSO a 0,6%) foi considerado como 100% de viabilidade celular e a viabilidade celular das amostras calculadas pela equação

$\% \text{ inibição} = \left(\frac{OD_{controle} - OD_{substância}}{OD_{controle} \times 100} \right)$, onde OD representa a absorbância das amostras. A

concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi obtida por regressão não linear.

4.5.4 Determinação do Índice de Seletividade

Para determinação do índice de seletividade (IS) utilizou-se a seguinte fórmula:

$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$, onde CC_{50} representa a concentração citotóxica para 50% das células avaliadas no

teste de citotoxicidade e IC_{50} representa a concentração inibitória para 50% das células avaliadas no teste de atividade das substâncias, perante formas amastigotas, considerando-se a mesma substância. Valores maiores ou iguais a 10 são considerados satisfatórios (PEREIRA *et al.*, 2010).

4.5.5 Ensaios de atividade inibitória sobre proteases

Com o intuito de avaliar a atividade das proteases, a hidrólise (Figura 06) do substrato peptídico fluorogênico (Z-FR-MCA) foi monitorada no $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ (comprimento de onda de excitação e emissão para o MCA, respectivamente) sendo o espectrofluorímetro calibrado com soluções padrão de MCA.

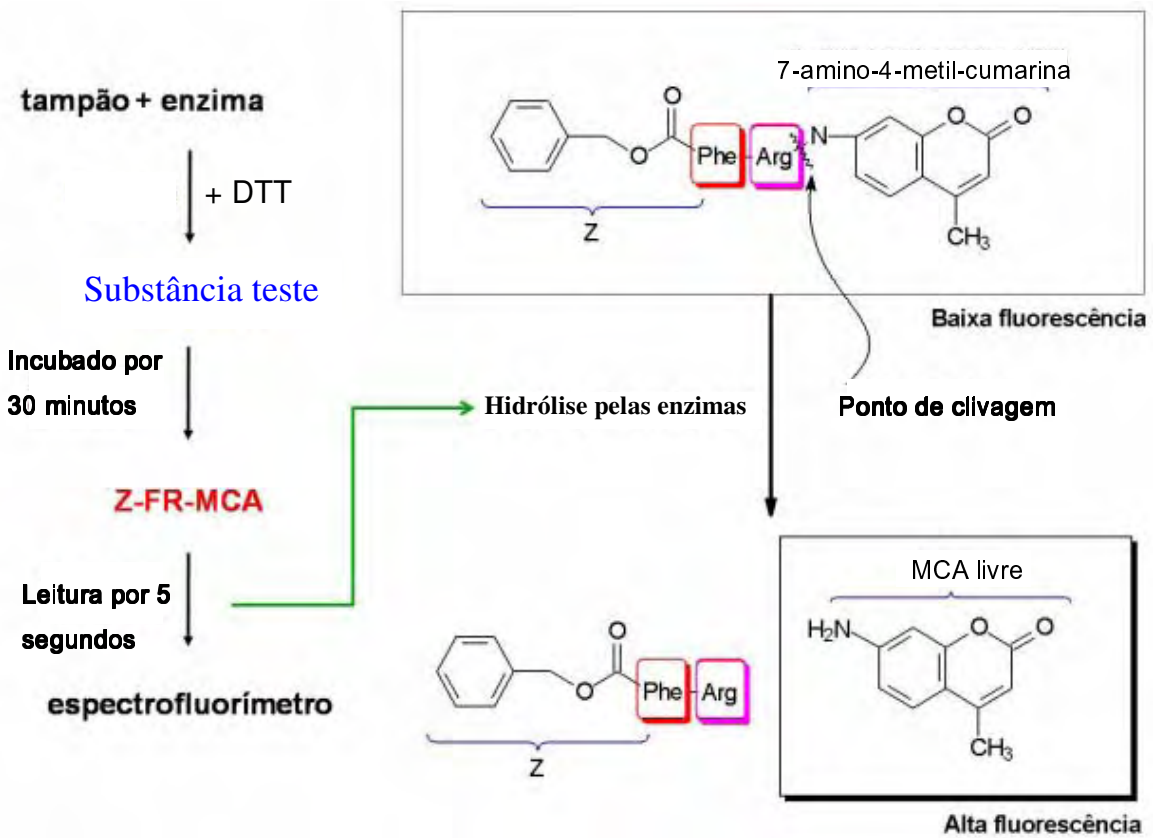


Figura 06 – Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas proteases.

Para avaliação da atividade inibitória sobre proteases, foram utilizados o *pool* de proteases obtido a partir da lise dos microrganismos (promastigotas e amastigotas), proteases previamente isoladas dos microrganismos (oligopeptidases B e C), Catapsina-L, enzimas recombinantes rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y e a cruzaina.

Para obtenção dos lisados de *L. (L.) amazonensis* obtiveram-se as formas promastigotas (mantidas em cultura) e amastigotas (recém isoladas de camundongos infectados) de *L. (L.) amazonensis* na concentração de $1,8 \times 10^6$ células/mL, estas foram lavadas três vezes em Tampão Fosfato Salino (PBS) a 0,15M (pH 7,2) por 10 minutos a centrifugação a 1500g, e estocadas a -70°C em alíquotas contendo $1,8 \times 10^6$ microrganismos.

No momento de realização dos testes, o lisado dos parasitos foi preparado em PBS 0,15M por 05 ciclos de ultrassonicação de 45 segundos cada, a 30 Hz, sob 0°C , com intervalo de 02 minutos entre cada ciclo. Após a exposição ao ultra-som, os lisados celulares foram centrifugados

a 5090g durante 05 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido utilizado nos testes (PEREIRA *et al.*, 2011).

As substâncias a serem avaliadas foram adicionadas ao *pool* de proteases obtido de promastigotas e de amastigotas em diferentes concentrações, em acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 e pH 8,0 (para amastigotas e promastigotas respectivamente) a 37°C, contendo 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DTT para ativação enzimática por 10 min, sendo a amostra sem a adição de drogas o controle positivo.

Oligopeptidases B e C são freqüentes em bactérias, plantas e tripanosomatídeos (COETZER *et al.*, 2008), tendo sido obtidas comercialmente (Sigma). A hidrólise do substrato peptídeo fluorogênico pelas enzimas foi realizada em Tampão Tris 100 mM, pH 8,0, a 37°C, contendo 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DTT para ativação enzimática por 10 min, seguido da adição, em várias concentrações, das substâncias a serem avaliadas.

A Catepsina-L, a cruzaina, a enzima rCPB2.8, e suas isoformas rCPB3 e rH84Y, de *L. (L.) mexicana* foram expressas, purificadas e ativadas (SANDERSON *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2001). A hidrólise do substrato peptídeo fluorogênico pelas enzimas foi realizada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, a 37°C, contendo 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DTT para ativação enzimática por 10 min, seguido da adição, em várias concentrações, das substâncias a serem avaliadas.

Para todas as enzimas e *pool* avaliados, após um período de incubação de 30 minutos a 37°C, junto a substância a ser avaliada, foi adicionado o substrato peptídico fluorogênico carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-7-amido-4-metilcumarina (Z-F-R-MCA) e imediatamente após excitação de composto MCA quebrado pela atividade enzimática a 380nm foi realizada leitura da emissão de fluorescência a 460nm, em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-1501, durante 05 segundos.

A partir dos valores obtidos e comparando-se com os resultados sem a adição de drogas foi calculado o IC₅₀ da inibição da atividade proteolítica com a utilização do software Grafit 5,0 (Erithacus Software Ltda) (MELO *et al.*, 2001).

4.5.6 Avaliação do poder seqüestrante de radicais DPPH

A medida da atividade seqüestrante de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen *et al.* (2005) com modificações. Adicionou-se 4,0 mL da solução

das amostras a serem testadas (nas concentrações de 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL) em etanol, a 1,0 mL de solução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram lidas as absorbâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/*vis* (em triplicata).

O DPPH é um radical estável, de cor púrpura quando em solução etanólica, apresentando uma banda de absorção a 517nm. Quando misturado a uma substância capaz de doar um hidrogênio e seqüestrar o seu radical, o DPPH passa a 1,1-difenil-2-picrilidrazina (DPPH-H) de cor amarela. Quanto menor a absorbância maior o potencial seqüestrante. Para avaliar a atividade captadora do radical, foi obtida a porcentagem de inibição, de acordo com a equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{ABS_{controle} - ABS_{amostra}}{ABS_{controle}} \times 100, \text{ sendo cada amostra analisada em triplicata e seus}$$

valores plotados para obtenção do IC₅₀ por regressão não linear.

A quercetina e o ácido ascórbico foram utilizados como controles positivos nas mesmas concentrações séricas.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística para a atividade leishmanicida foi realizada usando regressão não linear para se obter os valores de IC₅₀ (concentração que inibe o crescimento de 50% dos microrganismos) e CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células). Os resultados foram mostrados em porcentagem de inibição em relação ao controle. Os IC₅₀ da atividade inibitória enzimática foram demonstrados utilizando o software Grafit 5.0. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ (µg/mL) foram submetidos a análise de variância, seguida por comparação utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Os dados foram processados pelo software BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antipromastigota das diferentes partes de *A. brachypoda*

Inicialmente, foram preparados extratos hidro-etanólicos (na proporção etanol/água de 70:30 v/v), por percolação, a partir das folhas, caule e raízes, secas e trituradas, de *A. brachypoda*.

Após a obtenção destes três extratos (extratos brutos), os mesmos foram avaliados, *in vitro*, quanto ao seu potencial leishmanicida através da determinação de seus valores de IC₅₀ e IC₉₀ (concentração inibitória para 50% e 90% da cultura celular, respectivamente) perante promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os resultados foram comparados aos valores de inibição do medicamento padrão, Anfotericina B, apresentando o extrato das folhas um melhor resultado, com menores valores de IC₅₀ e IC₉₀, seguido pelo extrato do caule e da raiz, respectivamente, como mostrado na Tabela 01. Estes resultados levaram a continuidade dos estudos apenas com o extrato hidro-etanólico das folhas.

Tabela 01 – Valores de IC₅₀ e IC₉₀ do medicamento de referência e dos extratos hidro-etanólicos do caule, folhas e raiz de *A. brachypoda*, quanto a atividade antipromastigota de *L. (L.) amazonensis*.

	Anfotericina B	EtOH caule	EtOH folhas	EtOH raiz
IC ₅₀ (µg/mL)	3,68	9,32	4,85	15,32
IC ₉₀ (µg/mL)	8,82	23,52	14,89	34,36

5.2 Fracionamento do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda*

Uma vez selecionado o extrato das folhas como mais ativo perante promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, e como material para o desenvolvimento deste estudo, após sua obtenção com um rendimento de 14,3%, 4,0g do seu extrato hidro-etanólico (bruto), seco, foi ressuspendido em 98,5 mL de água + 1,5 mL de etanol, a solução foi então fracionado obtendo-se quatro novas frações, após a lavagem com os três solventes, a fração aquosa remanescente foi liofilizada para obtenção da fração aquosa seca, e cada uma das frações obtidas com os solventes, secas em evaporador rotatório para obtenção de seus respectivos extratos secos, avaliando-se seus rendimentos (Figura 07).

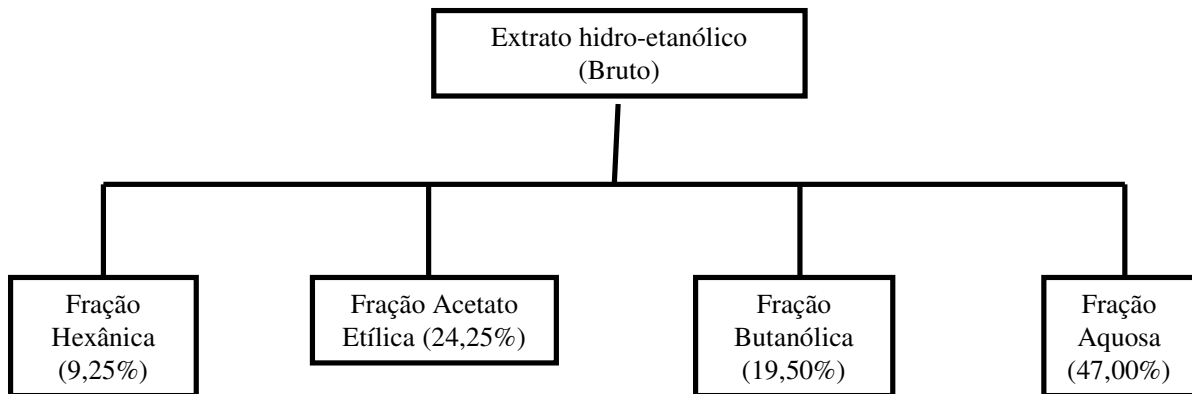


Figura 07 - Seqüência de obtenção das frações a partir do extrato hidro-etanólico das folhas de *A. brachypoda*, por partição líquido-líquido, com seus rendimentos.

5.3 Avaliação por UFLC-EM

Após avaliação preliminar do efeito antipromastigota *in vitro*, foi realizada a análise por UFLC-EM, visando uma compreensão dos resultados através do conhecimento do perfil químico do extrato e de cada uma das frações (Figuras 08 – 14).

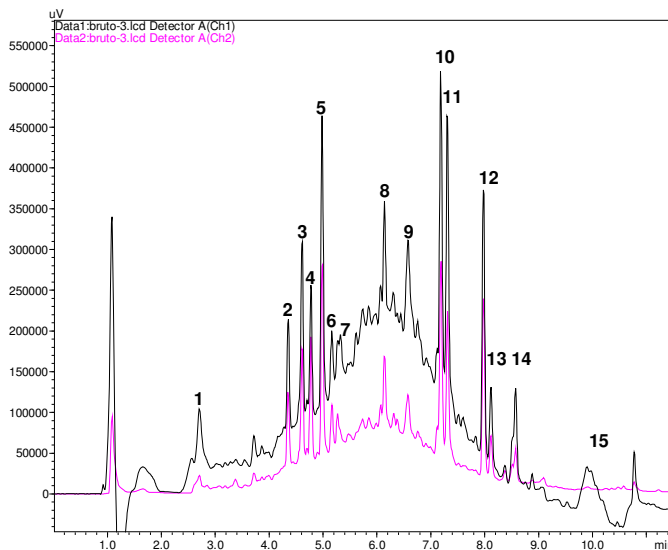


Figura 08 - Perfil cromatográfico (UFLC) do extrato Bruto obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μ m), eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.

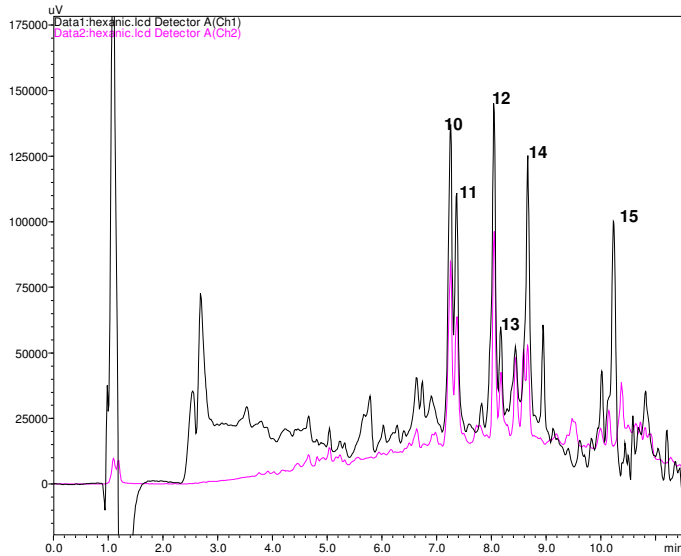


Figura 09 - Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Hexânica obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.

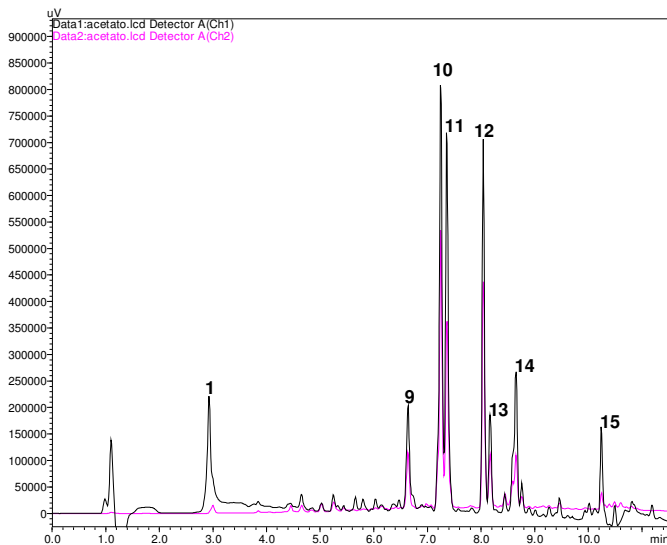


Figura 10 - Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Acetato Etilica obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.

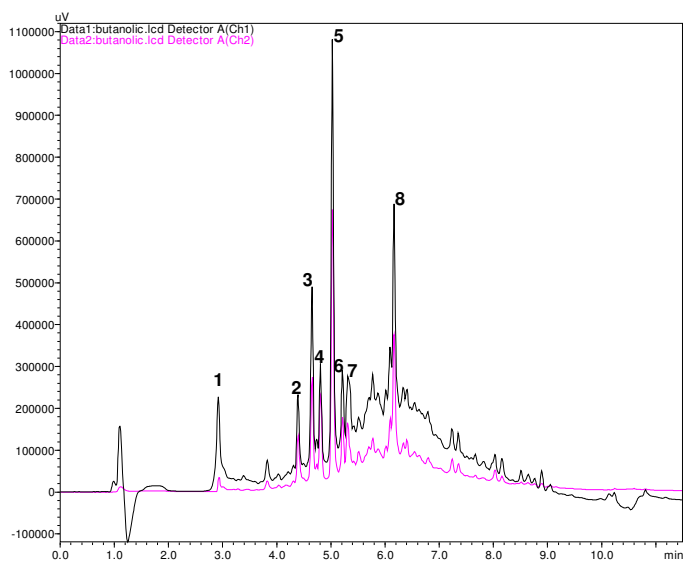


Figura 11 - Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Butanólica obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.

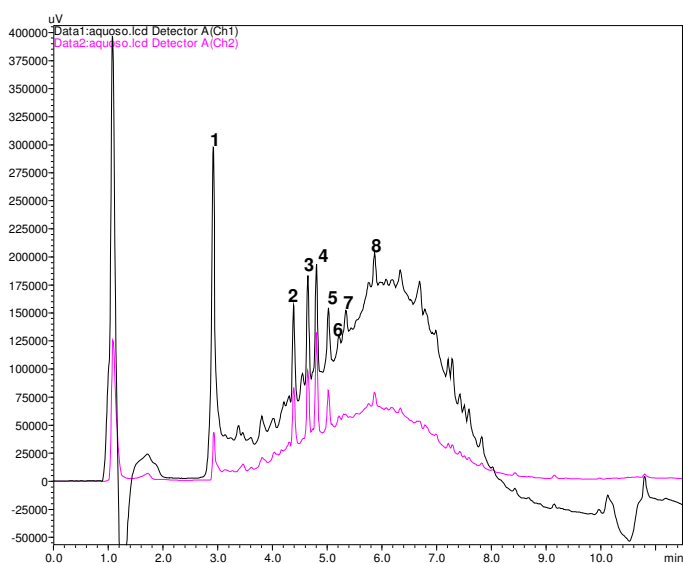


Figura 12 - Perfil cromatográfico (UFLC) da fração Aquosa obtido em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Ch1: detecção em 220 nm. Ch2: detecção em 272 nm.

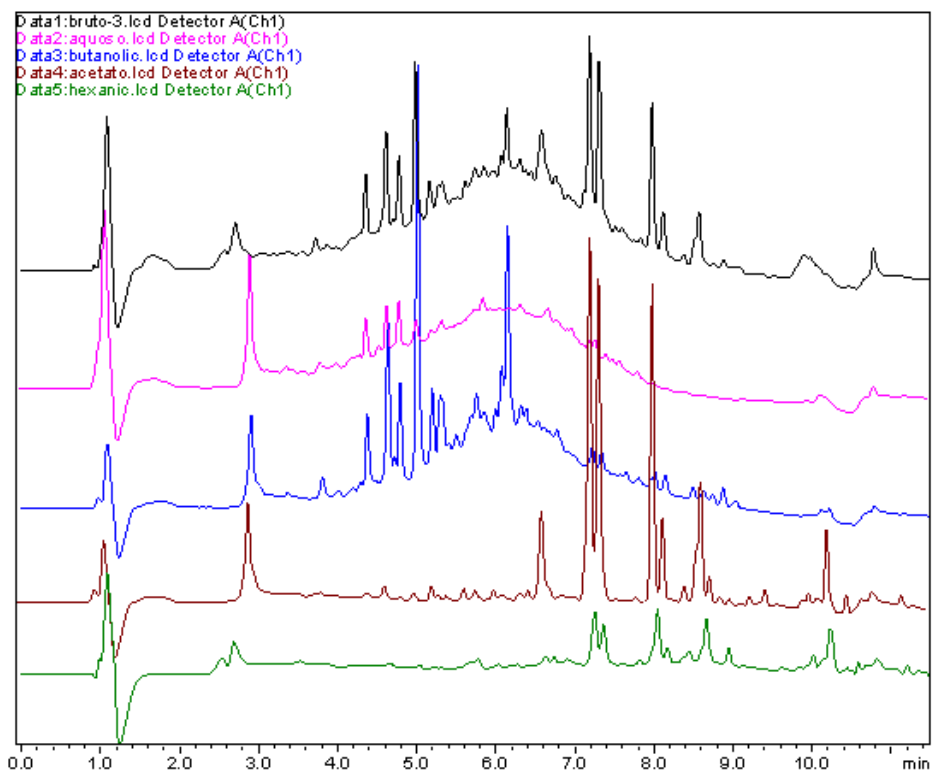


Figura 13 - Comparação entre os perfis cromatográficos do extrato bruto e suas frações, obtidos em coluna Shim-pack XR-ODS (75 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 2,2 μm), eluído com o sistema solvente A (água/TFA 1000:1) e B (ACN/água/TFA, 900:100:1) a um fluxo de 1mL/min e gradiente de A 0 a 100% em B em 8 minutos. A temperatura da coluna foi de 25°C. Detecção em 220 nm.

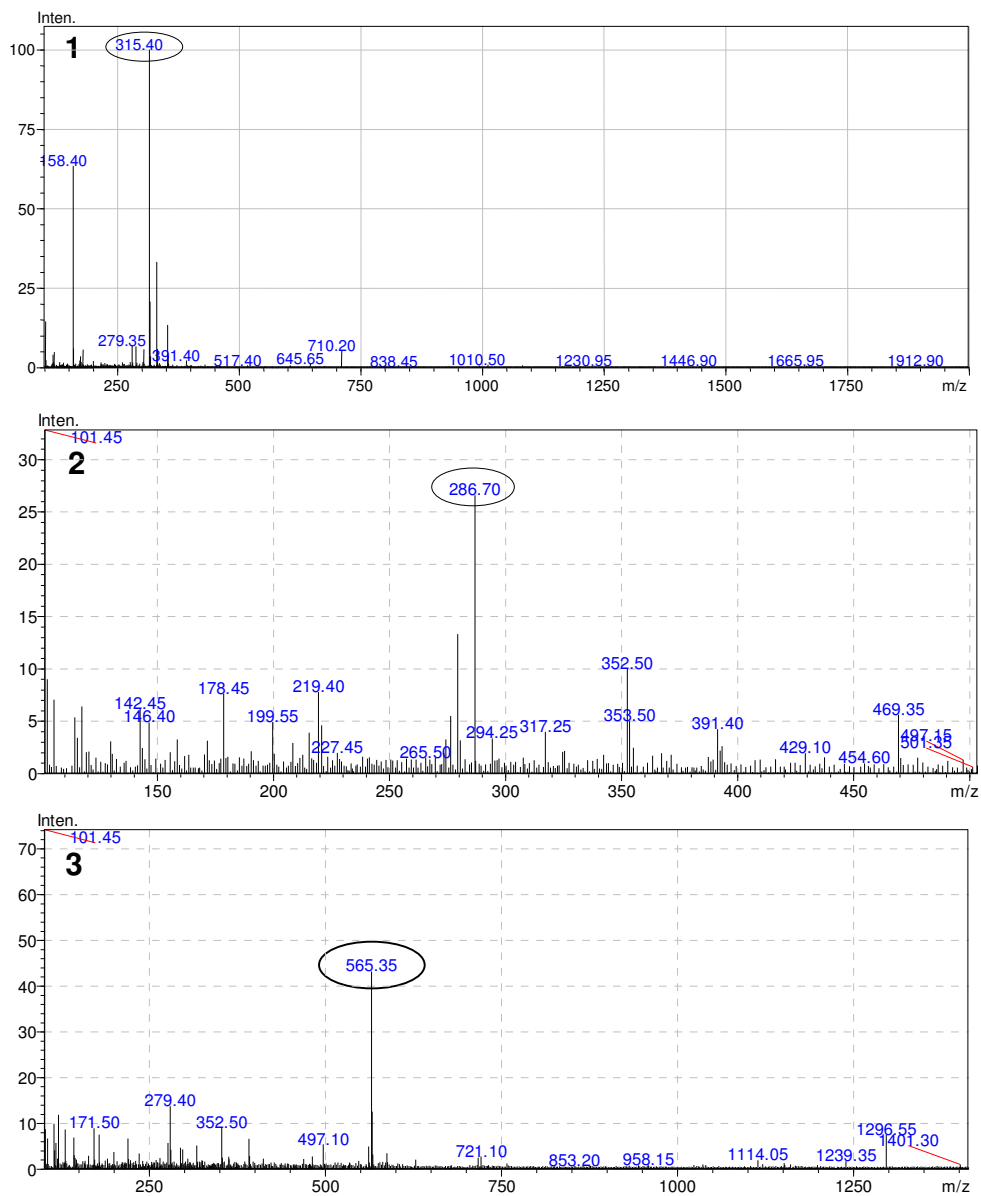


Figura 14 – Espectros de massas dos principais constituintes eluídos nos cromatogramas obtidos por UFLC utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão).

Continua na próxima página

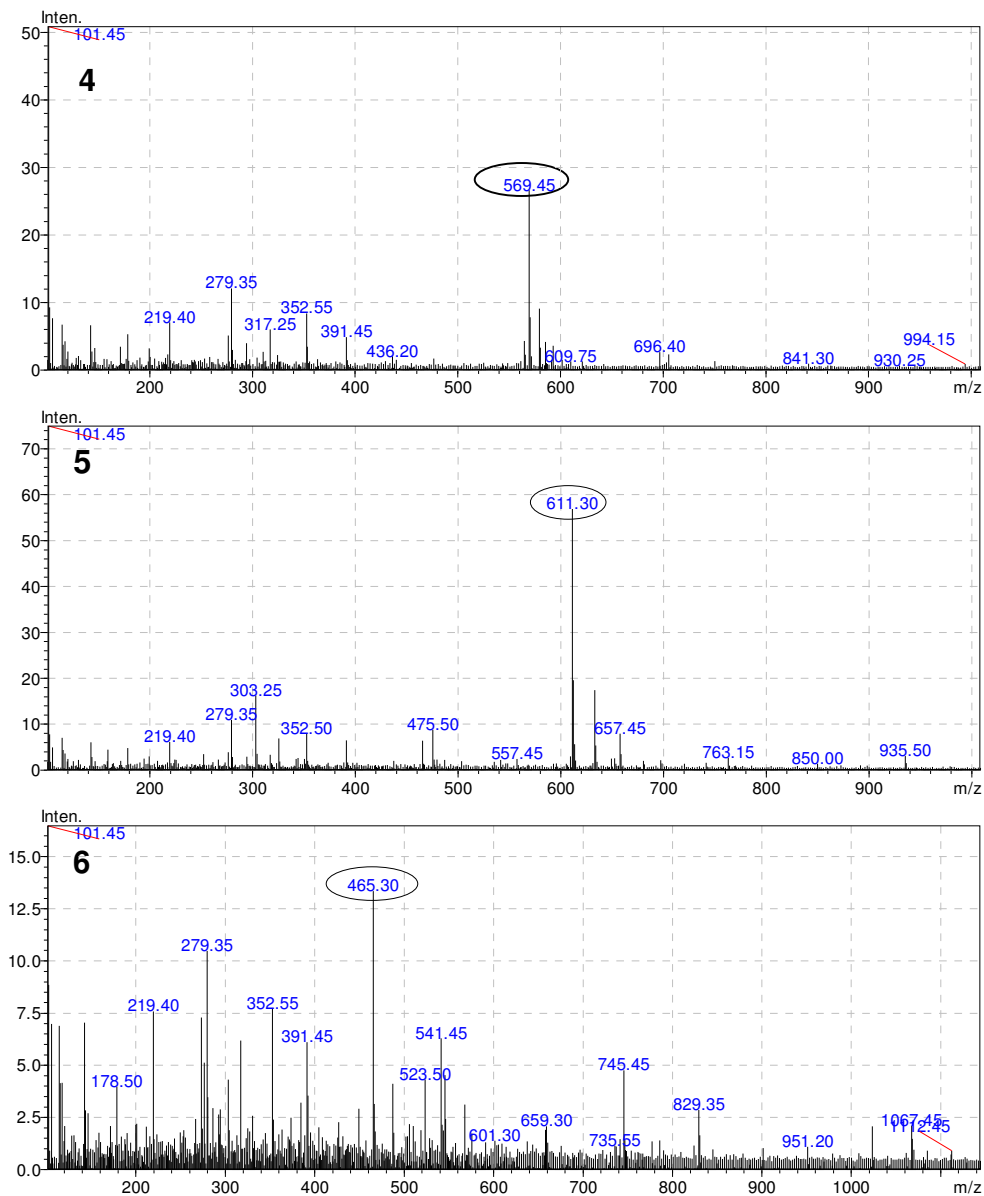


Figura 14 (continuação) - Espectros de massas dos principais constituintes eluídos nos cromatogramas obtidos por UFLC utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão).

Continua na próxima página

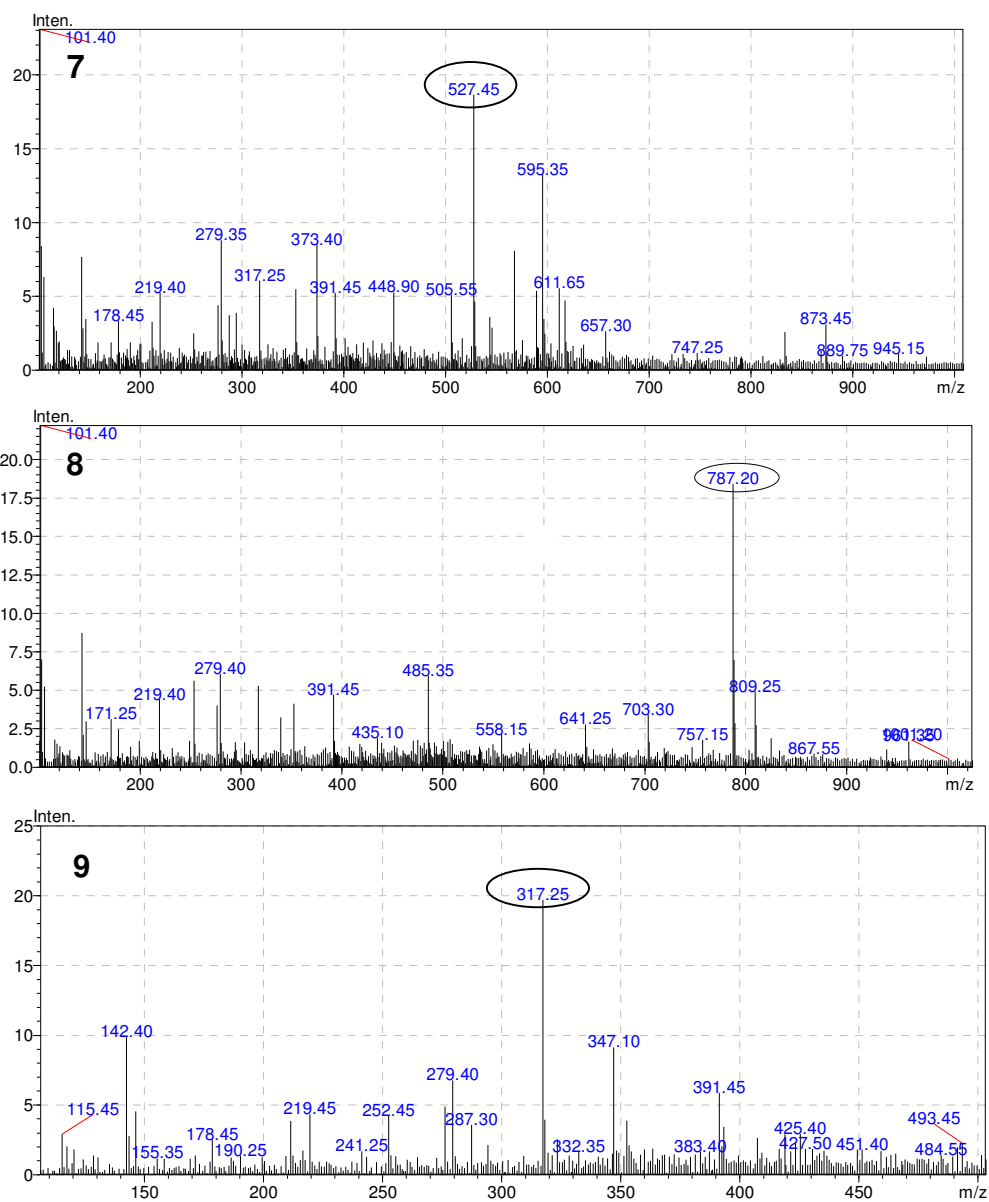


Figura 14 (continuação) - Espectros de massas dos principais constituintes eluídos nos cromatogramas obtidos por UFLC utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão).

Continua na próxima página

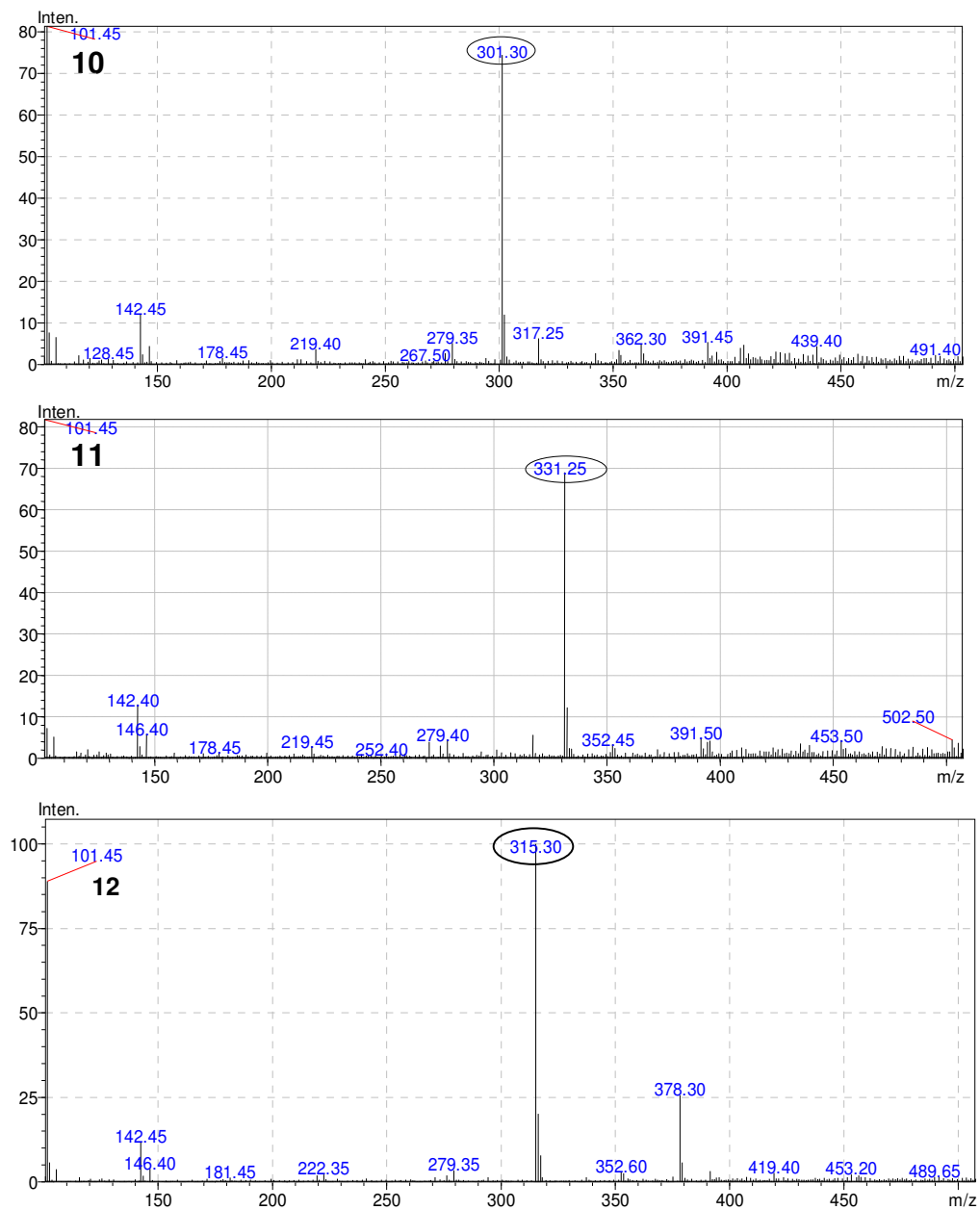


Figura 14 (continuação) - Espectros de massas dos principais constituintes eluídos nos cromatogramas obtidos por UFLC utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão).

Continua na próxima página

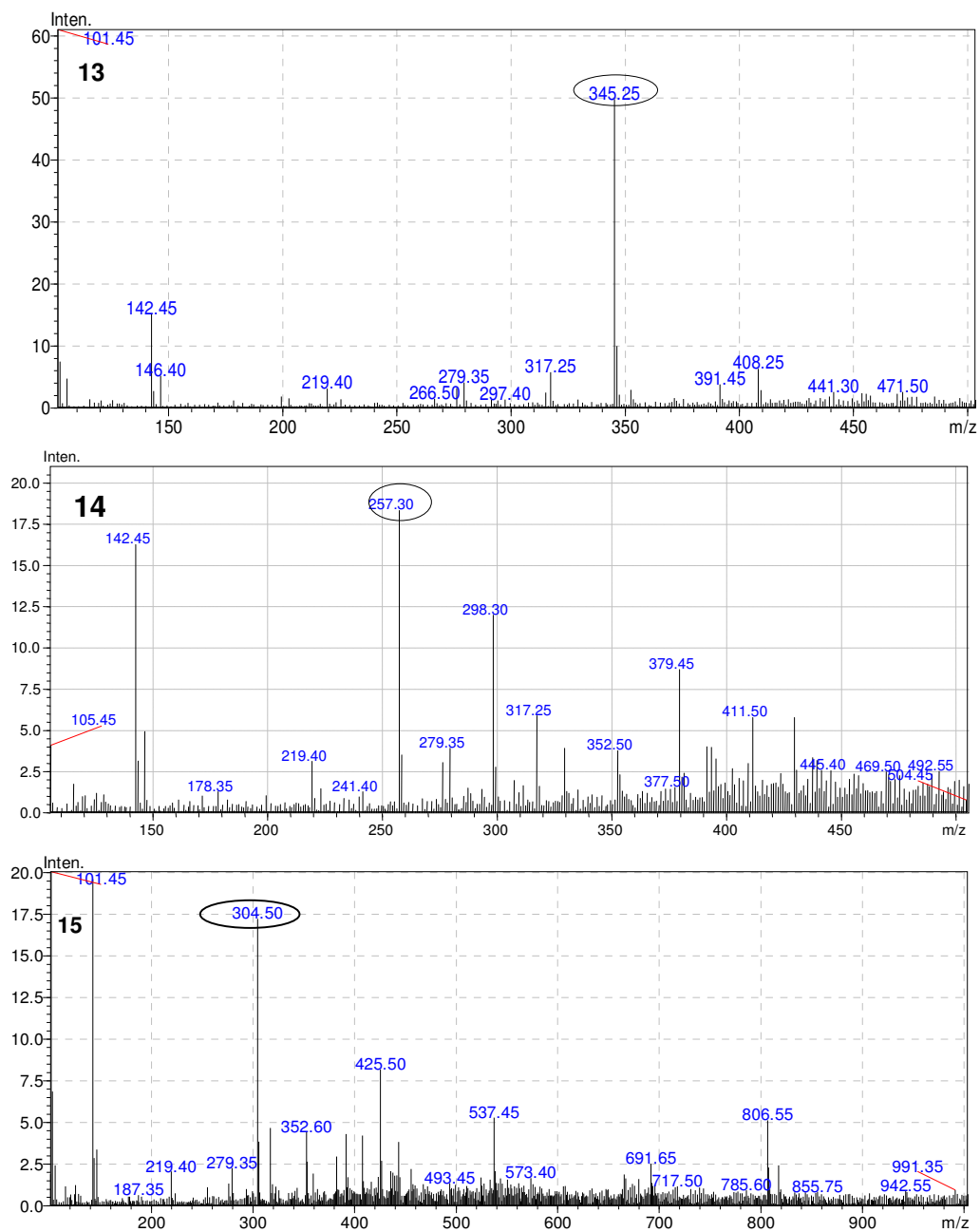


Figura 14 - Espectros de massas dos principais constituintes eluídos nos cromatogramas obtidos por UFLC utilizando um detector do tipo quadrupolo LCMS-2020EV equipado com um módulo de ionização por *electrospray* ESI-probe (Shimadzu, Tokyo, Japão).

5.4 Atividade leishmanicida e citotoxicidade

Após estudo cromatográfico e o estudo do perfil químico dos principais compostos do extrato e frações por espectrometria de massas, pode-se detectar a variabilidade química deste extrato e frações, com base na qual realizou-se a avaliação destes perante promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, preliminarmente, como início de estudo, quanto a atividade leishmanicida, *in vitro*, nas concentrações de 10 e 40 µg/mL (Tabela 02).

Tabela 02 - Porcentagem de inibição de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento de 72 horas com extrato bruto e frações das folhas de *A. brachypoda*.

Substância	% de inibição
Controle	0
Bruto (10µg/mL)	72,23
Bruto (40µg/mL)	99,14
Hx (10µg/mL)	88,35
Hx (40µg/mL)	91,64
AcEt (10µg/mL)	83,65
AcEt (40µg/mL)	95,6
But (10µg/mL)	32,07
But (40µg/mL)	99,14
Aq (10µg/mL)	0
Aq (40µg/mL)	0

Após análise prévia do extrato bruto e frações quanto a atividade antipromastigota, onde todas as substâncias avaliadas apresentaram resultados de inibição expressivos, à exceção da fração Aquosa, realizou-se a avaliação destes perante promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, obtendo-se os valores de IC₅₀ de cada amostra, assim como a avaliação da citotoxicidade, através da determinação da concentração citotóxica para 50% da cultura celular (CC₅₀) de macrófagos peritonias murinos, recém isolados, possibilitando o cálculo do Índice de Seletividade (IS) das amostras avaliadas (PEREIRA *et al.*, 2010) tendo a anfotericina B como substância de referência. Tanto o extrato bruto como as frações (a exceção da Aquosa)

apresentaram resultados satisfatórios perante promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e baixa citotoxicidade quanto aos macrófagos murinos, resultando em altos IS's, apresentando o melhor resultado a fração Acetato Etílica, sendo os valores das frações Hexânica e Butanólica estatisticamente equivalentes entre si a um nível de significância de 5% (Tabela 03).

Tabela 03 - Valores de IC₅₀ de inibição de crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, CC₅₀ dos macrófagos peritoneais murinos, e cálculo do Índice de Seletividade do extrato bruto e frações, tendo a anfotericina B como substância de referência para atividade leishmanicida (amastigotas).

Substância	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀	IS
	promastigotas	amastigotas	(µg/mL)	
Extrato Bruto	4,85 ± 0,21 ^{a, b}	33,5 ± 0,29	>160,00	>4,78
Fração Hexânica	2,02 ± 0,07	14,7 ± 0,12 ^a	64,20	4,22 ^a
Fração Acetato Etílica	3,94 ± 0,13 ^a	14,1 ± 0,08 ^a	151,62	10,75
Fração Butanólica	15,73 ± 1,20	38,7 ± 0,83	160,86	4,17 ^a
Fração Aquosa	> 100,00	> 100,00	>160,00	ND
Anfotericina B	3,68 ± 0,11 ^b	4,35 ± 0,13	ND	ND

$p > 0,05$; ^a e ^b: médias não distintas estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ND: valores não determinados.

Foi também calculada a contribuição individual de cada uma das frações obtidas para o resultado final quanto a atividade anti-amastigota, de acordo com Pereira *et al.* (2010), levando-se em consideração a atividade de cada uma das frações perante esta forma do parasito, na determinação de seu IC₅₀, e a sua porcentagem de participação na composição do extrato bruto, o que nos permite avaliar a sinergia ou não das frações quanto a atividade anti-amastigota (Tabela 04).

Tabela 04 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade anti-amastigota

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	14,7	14,1	38,7	>100			
RM x IC ₅₀	1,36	3,42	7,52	47	59,32	33,50	0,56

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀ : concentração necessária para inibição de 50% das formas amastigotas em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀ : valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀) : razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e da somatória das contribuições individuais para a atividade anti-amastigota, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

5.5 Ensaios enzimáticos fluorimétricos

5.5.1 Pool de enzimas de promastigotas e amastigotas

Na busca de elucidar um possível mecanismo de ação, o extrato bruto e frações foram avaliados quanto a capacidade inibitória da atividade proteolítica do *pool* de proteases extraídas de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, em soluções de pH 8,0 e 5,5, respectivamente (Figuras 15 e 16), apresentando os valores de IC₅₀ de inibição descritos na Tabela 05.

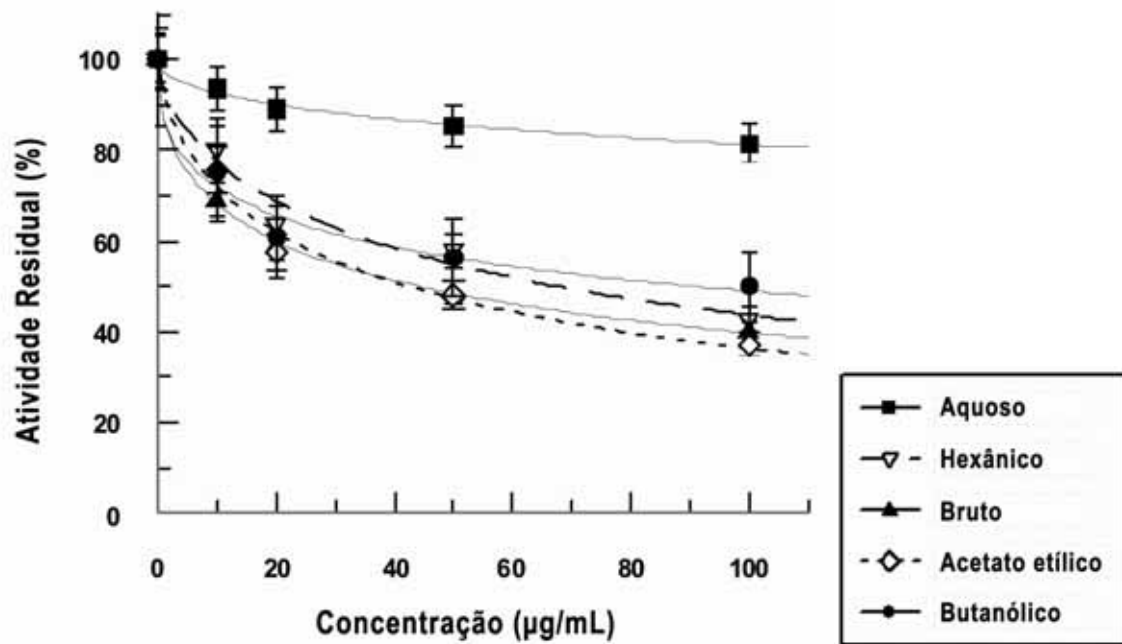


Figura 15 - Curva de inibição do extrato bruto e frações em diferentes concentrações sobre o *pool* de proteases extraído de promastigostas de *L. (L.) amazonensis* em solução de pH 8,0.

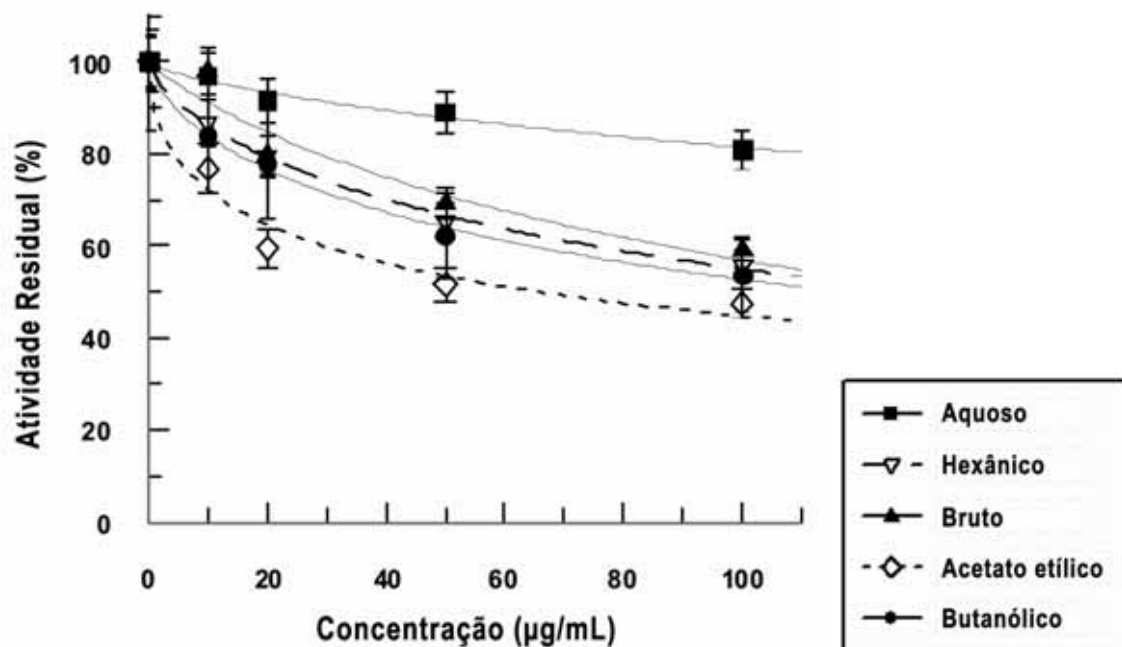


Figura 16 - Curva de inibição do extrato bruto e frações em diferentes concentrações sobre o *pool* de proteases extraído de amastigostas de *L. (L.) amazonensis* em solução de pH 5,0.

Tabela 05 - Valores de IC₅₀ de inibição do *pool* de proteases extraídos de amastigotas (pH 5,0) e promastigotas (pH 8,0) de *L. (L.) amazonensis*, tratados com o extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações.

<i>Extrato/Fração</i>	<u>IC₅₀ (µg/mL)</u>	
	<i>Amastigotas</i>	<i>Promastigotas</i>
Bruto	136.3 ± 36.2 ^a	44.3 ± 1.7 ^a
Hexânica	132.1 ± 6.1 ^a	67.5 ± 10.5 ^b
Acetato Etfílica	65.3 ± 15.5	43.3 ± 5.0 ^a
Butanólica	116.7 ± 8.5 ^a	90.6 ± 23.0 ^b
Aquosa	>200	>200

$p > 0,05$; ^a e ^b: médias não distintas estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Calculou-se também a contribuição individual de cada uma das frações obtidas para o resultado final quanto a atividade inibitória do *pool* de enzimas de amastigotas, de acordo com Pereira *et al.* (2010), levando-se em consideração a atividade de cada uma das frações perante este grupo de enzimas, na determinação de seu IC₅₀, e a sua porcentagem de participação na composição do extrato bruto, o que nos permite avaliar a sinergia ou não das frações quanto a atividade inibitória neste grupo enzimático (Tabela 06).

Tabela 06 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre o *pool* de enzimas de amastigotas

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	132,1	65,3	116,7	>200			
RM x IC ₅₀	12,22	15,84	22,76	94	144,82	136,3	0,94

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/Σ(RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

5.5.2 Oligopeptidases B e C

Como o extrato bruto e suas frações apresentaram resultados satisfatórios perante o *pool* de enzimas das formas amastigotas e promastigotas, foram então avaliados quanto a inibição da atividade proteolítica de Oligopeptidases B e C, que são enzimas purificadas, representativas da classe das serino proteases, presentes nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, entre outros, que estão intimamente relacionadas a capacidade de ataque de tripanosomatídeos às células de seu hospedeiro, identificando-se assim efeitos significativos de inibição, como mostrado nas Figuras 17 e 18 e sumarizado na Tabela 07.

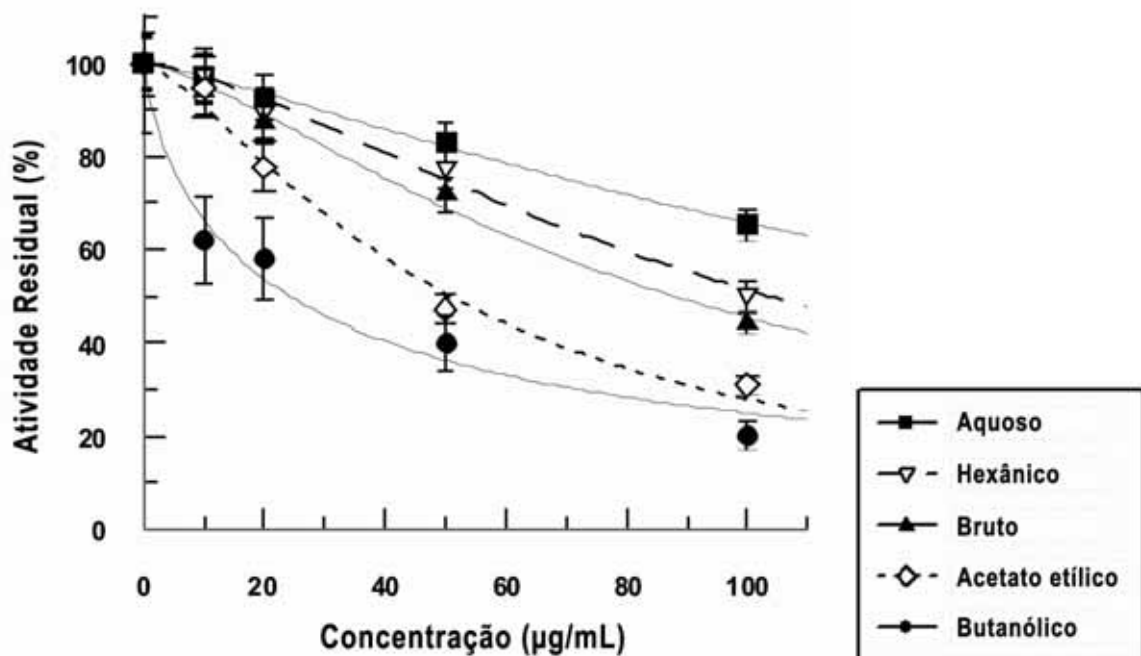


Figura 17 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações em diferentes concentrações perante Oligopeptidase B.

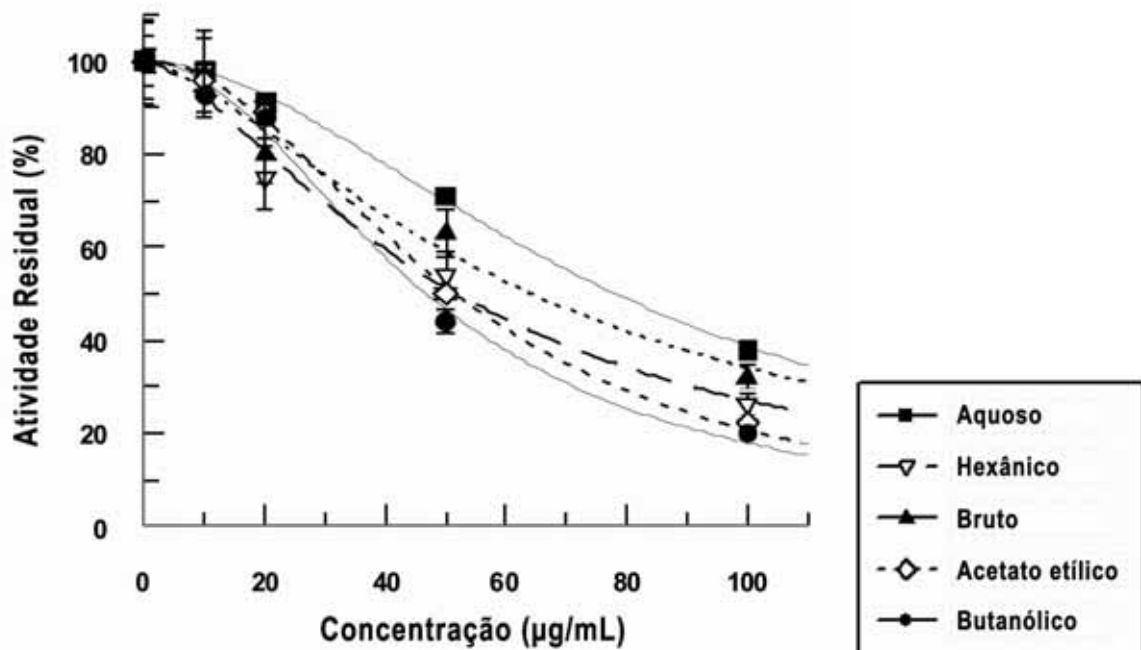


Figura 18 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações em diferentes concentrações perante Oligopeptidase C.

Tabela 07 - Valores de IC_{50} do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações em relação a inibição das Oligopeptidases B e C.

Extrato / Fração	Valores de IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$	
	Oligopeptidase B	Oligopeptidase C
Bruto	$95,3 \pm 8,1^a$	$64,1 \pm 5,2$
Hexânica	$98,8 \pm 8,1^{a, b}$	$51,7 \pm 4,7^a$
Acetato Etflica	$50,8 \pm 3,5$	$51,6 \pm 1,3^a$
Butanólica	$26,5 \pm 2,7$	$46,7 \pm 2,3^a$
Aquosa	$115,9 \pm 7,7^b$	$78,1 \pm 1,7$

$p > 0,05$; ^a e ^b: médias não distintas estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Calculou-se também a contribuição individual de cada uma das frações obtidas para o resultado final quanto a atividade inibitória sobre as oligopeptidases B e C, de acordo com Pereira *et al.* (2010), levando-se em consideração a atividade de cada uma das frações perante este grupo de enzimas, na determinação de seu IC_{50} , e a sua porcentagem de participação na composição do

extrato bruto, o que nos permite avaliar a sinergia ou não das frações quanto a atividade inibitória sobre estas oligopeptidases, representantes do grupo das serino proteases (Tabelas 08 e 09).

Tabela 08 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre oligopeptidase B.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	98,80	50,80	26,50	115,90			
RM x IC ₅₀	9,20	12,32	5,17	54,47	81,16	95,30	1,17

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

Tabela 09 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre oligopeptidase C.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	51,70	51,60	46,70	78,10			
RM x IC ₅₀	4,78	12,51	9,11	36,71	63,11	64,10	1,02

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

5.5.3 Cisteíno proteases isoladas (Catepsina-L, rCPB2.8, rCPB3.0, rH84Y e cruzaina)

Após avaliação sobre as oligopeptidases B e C, que são serino proteases genéricas de vários microrganismos, também presentes em tripanosomatídeos, avaliou-se a atividade inibitória do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações perante a Catepsina-L, que é uma cisteíno protease necessária a sobrevivência de *L. (L.) mexicana* dentro de macrófagos *in vitro*

(DENISE *et al.*, 2003), como mostrado na Figura 19, estando os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 10. Com base nos resultados obtidos para a Catepsina-L, considerando que as CP são necessárias para o parasitismo intracelular ser bem sucedido (ALVAREZ *et al.*, 2012) e as CPB's são enzimas do tipo Catepsina-L, a cisteíno protease rCPB2.8 (Figura 20), de *L.(L.) mexicana*, e suas isoformas rCPB3.0 (Figura 21) e rH84Y (Figura 22), foram também avaliadas quanto a sua inibição perante o extrato bruto e suas frações, estando os resultados de IC₅₀ sumarizados na Tabela 11.

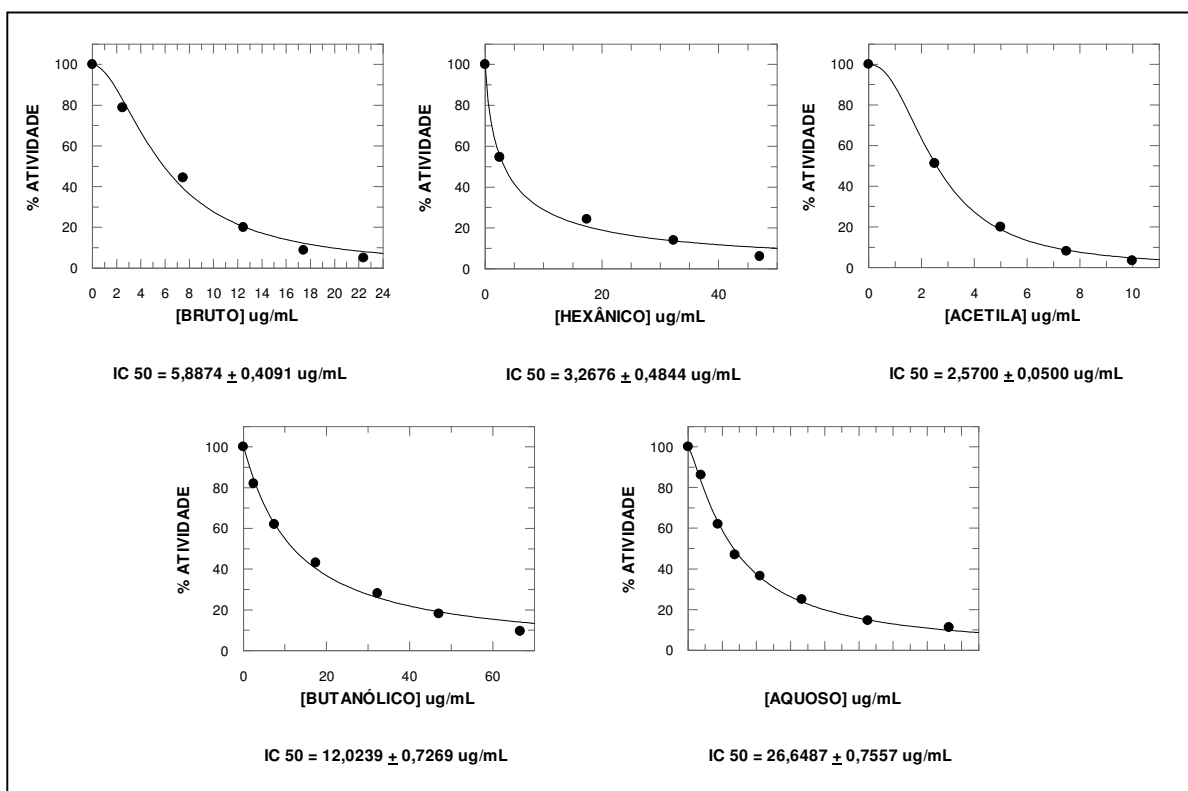


Figura 19 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease Catepsina-L.

Tabela 10 - Valores de IC₅₀ do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações em relação a inibição da cisteíno protease Catepsina-L.

Extrato/Frações	Valor de IC ₅₀ em µg/mL
Bruto	5,8874 ± 0,4091
Hexânica	3,2676 ± 0,4844*
Acetato-etílica	2,5700 ± 0,0500*
Butanólica	12,0239 ± 0,7269
Aquosa	26,6487 ± 0,7557

$p > 0,05$; * : médias não distintas estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

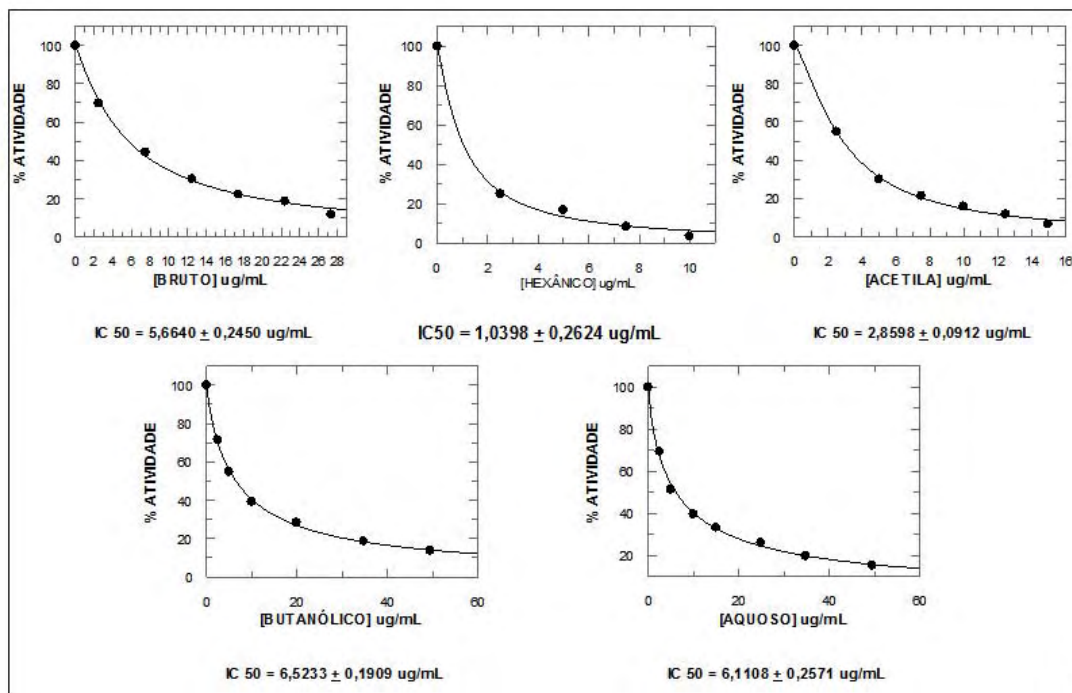


Figura 20 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease rCPB2.8.

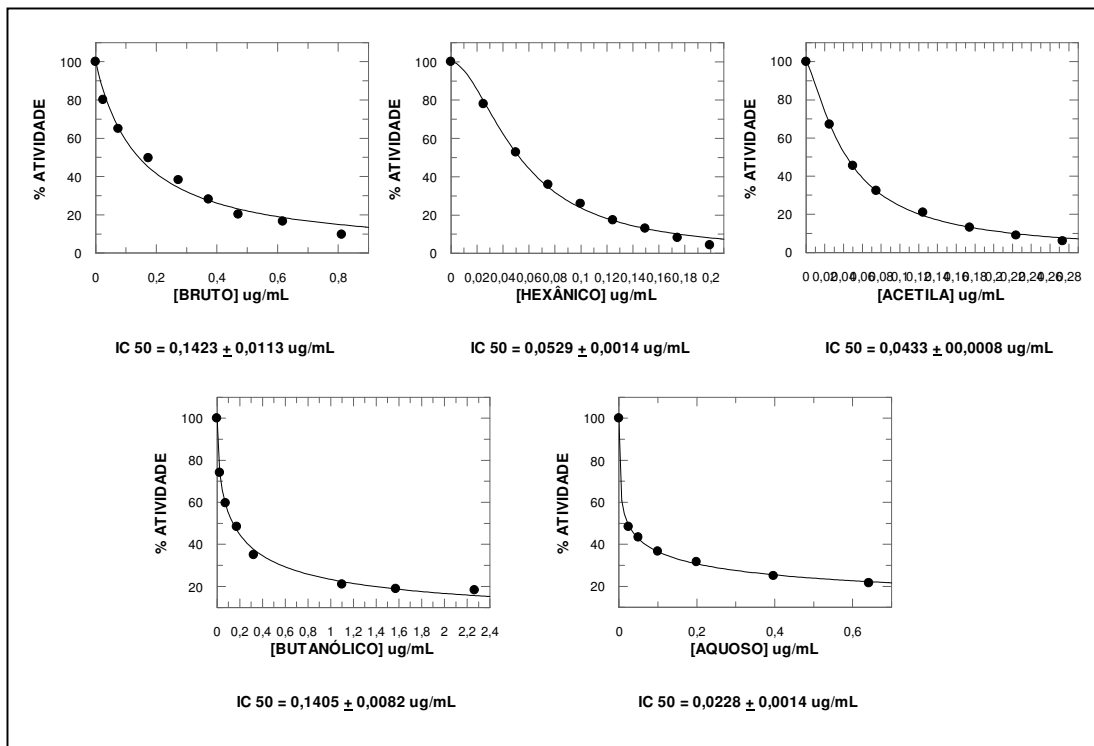


Figura 21 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease rCPB3.0.

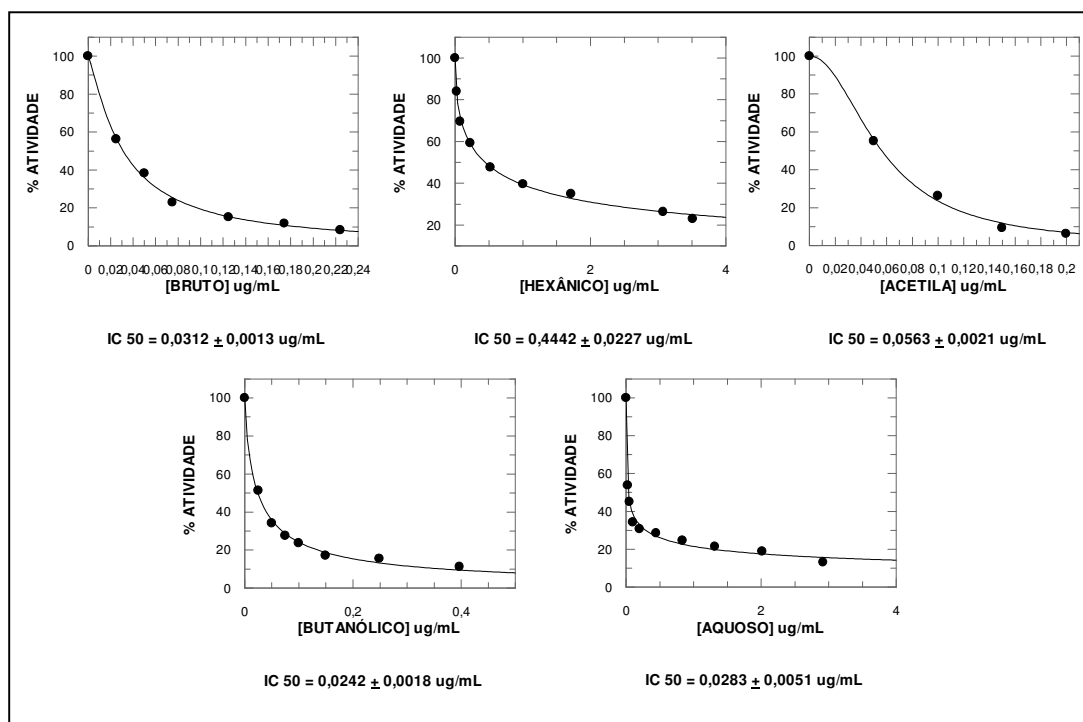


Figura 22 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease rH84Y.

Tabela 11 - Valores de IC₅₀ do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações em relação a inibição da cisteíno protease rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3.0 e rH84Y.

Extrato / Fração	Valores de IC ₅₀ em µg/mL		
	rCPB2.8	rCPB3.0	rH84Y
Bruto	5,6640 ± 0,2450 ^a	0,1423 ± 0,0113 ^a	0,0312 ± 0,0017 ^a
Hexânica	1,0398 ± 0,2624	0,0529 ± 0,0014 ^b	0,4442 ± 0,0227
Acetato Etilica	2,8598 ± 0,0912	0,0433 ± 0,0008 ^b	0,0563 ± 0,0021 ^a
Butanólica	6,5233 ± 0,1909 ^b	0,1405 ± 0,0082 ^a	0,0242 ± 0,0018 ^a
Aquosa	6,1108 ± 0,2571 ^{a, b}	0,0228 ± 0,0014	0,0283 ± 0,0051 ^a

$p > 0,05$; ^a e ^b: médias não distintas estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após a determinação do valor de IC₅₀ de inibição das cisteíno proteases Catepsina-L, rCPB2.8 e suas duas isoformas, rCPB3.0 e rH84Y, calculou-se também a contribuição individual de cada uma das frações obtidas para o resultado final quanto a atividade inibitória sobre estas, de acordo com Pereira *et al.* (2010), levando-se em consideração a atividade de cada uma das frações perante cada uma das enzimas, na determinação de seu IC₅₀, e a sua porcentagem de participação na composição do extrato bruto, o que nos permite avaliar a sinergia ou não das frações quanto a atividade inibitória sobre estas cisteíno proteases (Tabelas 12, 13, 14 e 15).

Tabela 12 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre Catepsina-L.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	3,2676	2,5700	12,0239	26,6487			
RM x IC ₅₀	0,30225	0,62323	2,34466	12,52489	15,7950	5,8874	0,373

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/Σ(RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

Tabela 13 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre rCPB2.8.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	1,04	2,86	6,52	6,11			
RM x IC ₅₀	0,09618	0,69350	1,27204	2,87207	4,93379	5,66	1,147

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

Tabela 14 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre rCPB3.0.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	0,0529	0,0433	0,1405	0,0228			
RM x IC ₅₀	0,00489	0,01050	0,02739	0,01071	0,05349	0,1423	2,66031

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

Tabela 15 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre rH84Y.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	0,4442	0,0563	0,0242	0,0283			
RM x IC ₅₀	4,10885	1,36527	0,47190	1,33010	7,27612	0,0312	0,00429

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

Avaliou-se ainda a ação inibitória do extrato bruto e frações perante a cruzaina (Figura 23), uma cisteíno protease isolada de outro membro da família Tripanosomatidae, o *T. cruzi*, agente causal da doença e Chagas, uma doença endêmica em todos os países da América Latina, com uma população de infectados estimada em 11 a 18 milhões de pessoas (BARRETT *et al.*, 2003), estando os resultados de IC₅₀ sumarizados na Tabela 16.

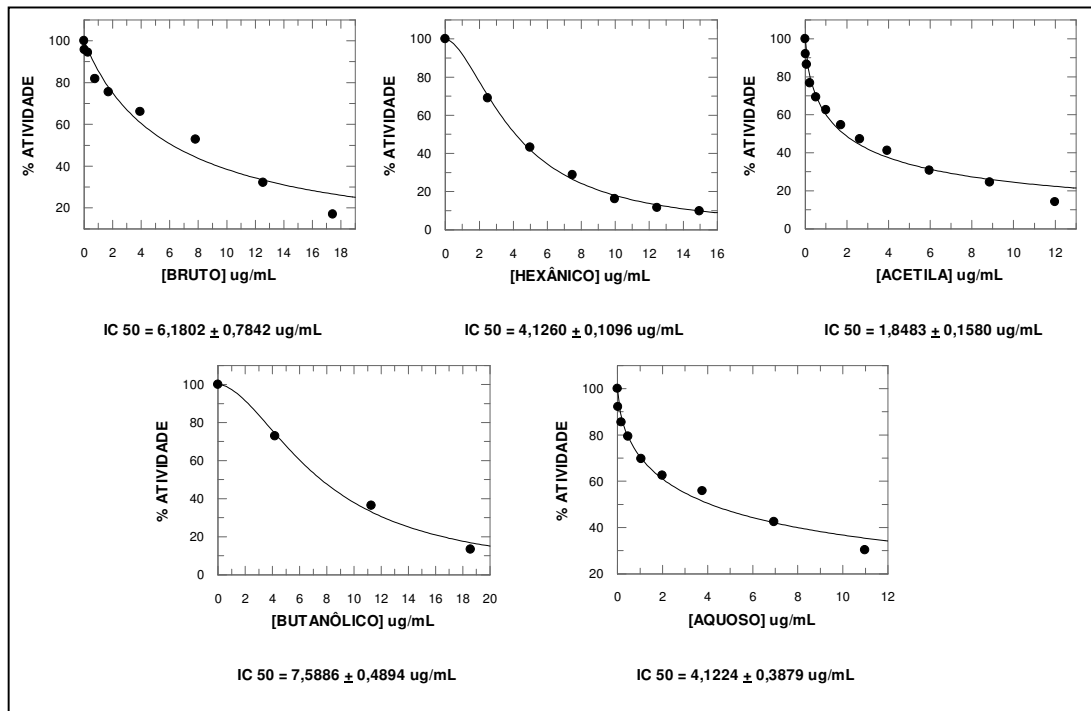


Figura 23 - Curvas de inibição do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, em diferentes concentrações perante a cisteíno protease cruzaina.

Tabela 16 - Valores de IC₅₀ do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações em relação a inibição da cisteíno protease cruzaina.

Extrato / Fração	Valores de IC ₅₀ em µg/mL
Bruto	6,1802 ± 0,7842
Hexânica	4,1260 ± 0,1096*
Acetato Etilica	1,8483 ± 0,1580
Butanólica	7,5886 ± 0,4894
Aquosa	4,1224 ± 0,3872*

$p > 0,05$; * : médias não distintas estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Determinado o valor de IC₅₀ de inibição da cruzaina, uma importante cisteíno protease, calculou-se também a contribuição individual de cada uma das frações obtidas para o resultado final quanto a atividade inibitória sobre esta, de acordo com Pereira *et al.* (2010), como mostrado na Tabela 17 .

Tabela 17 - Contribuição individual de cada uma das frações para a atividade inibitória sobre cruzaina.

FR	Hx	AcEt	But	Aq	Σ (RM x IC ₅₀)	Bruto IC ₅₀	Bruto IC ₅₀ / Σ (RM x IC ₅₀)
RM	9,25	24,25	19,5	47			
IC ₅₀	4,1260	1,8483	7,5886	4,1224			
RM x IC ₅₀	0,38165	0,44821	1,47977	1,93753	4,24716	6,1802	1,45514

FR: fração; RM: massa relativa em relação ao extrato bruto, em porcentagem; IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática em µg/mL; RM x IC₅₀: produto da RM pelo valor de IC₅₀; Σ (RM x IC₅₀): somatório da razão entre a massa relativa e o valor de IC₅₀; Bruto IC₅₀: valor de IC₅₀ do extrato bruto; Bruto IC₅₀/ Σ (RM x IC₅₀): razão entre o valor de IC₅₀ do extrato bruto e do somatório das contribuições individuais para a atividade inibitória, valores < 1 indicam sinergismo entre as frações.

5.6 Atividade antioxidante

Na busca de uma correlação entre as atividades leishmanicida e antioxidante do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, os mesmos foram também avaliados quanto ao seu potencial seqüestrante de radicais DPPH, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL. Os resultados estão expressos na Figura 24. Os resultados de capacidade seqüestrante de radicais DPPH do extrato bruto e suas frações foram comparados aos dados obtidos para os antioxidantes de referência, ácido ascórbico (AA) e quercetina, não apresentando o extrato bruto e tampouco suas frações atividade seqüestrante de radicais DPPH significativa.

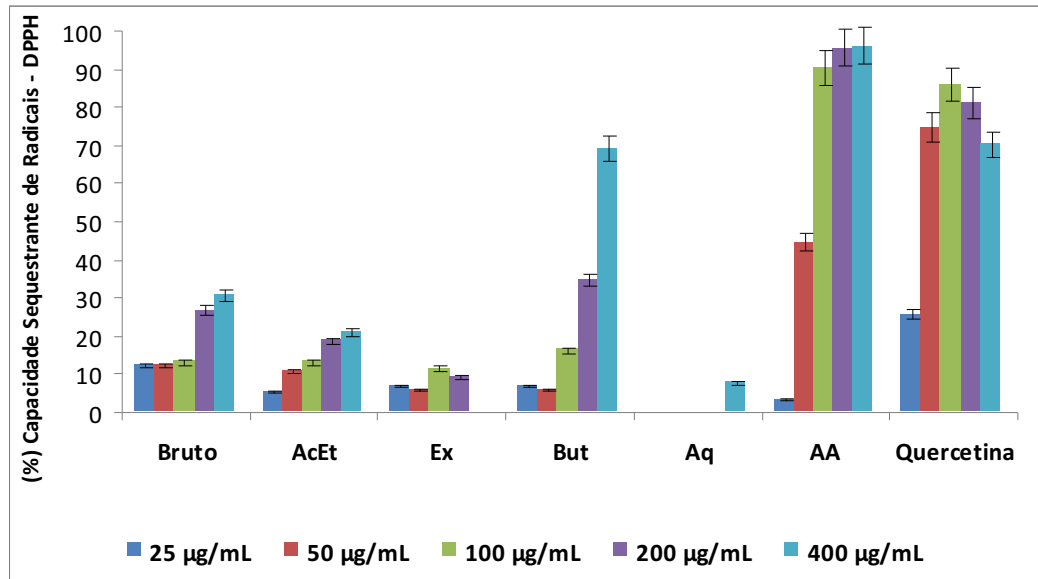


Figura 24 - Avaliação do extrato bruto das folhas de *A. brachypoda* e suas frações, em diferentes concentrações, quanto ao potencial seqüestrante de radicais DPPH.

6 DISCUSSÃO

Não há vacina disponível contra leishmaniose e os tratamentos disponíveis atualmente estão longe do ideal (CROFT; OLLIARO, 2011). O surgimento de resistência aos medicamentos atualmente utilizadas, a eficácia variável, a toxicidade, a necessidade de administração parenteral e de longos períodos de tratamento representam os principais problemas das atuais substâncias leishmanicidas disponíveis no mercado farmacêutico mundial (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012), existindo uma necessidade urgente de desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças causadas por microrganismos, as quais afetam, principalmente, pessoas em países em desenvolvimento (SINGH *et al.*, 2012).

Os vegetais representam uma importante fonte de agentes terapêuticos na busca por novos e seletivos compostos para o tratamento de doenças tropicais causadas por microrganismos, cenário onde se destacam as doenças parasitárias causadas por protozoários, devido ao alto número de pessoas acometidas ou vivendo em áreas de risco (KEDZIERSKI, 2010). Muitos estudos vêm mostrando que os produtos naturais representam uma diversa fonte de compostos na descoberta de novas substâncias e no desenvolvimento de agentes a serem utilizados no

tratamento de doenças causadas por microrganismos (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUES, 2001).

Recentemente, produtos naturais de diferentes origens biossintéticas e diferentes grupos químicos, têm sido isolados e têm mostrado atividade sobre diferentes espécies de microrganismos (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; SINGH *et al.* 2008; PEREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012).

Neste estudo, após o preparo do extrato hidro-etanólico (70:30 v/v) de diferentes partes (caule, raízes e folhas) de *A. brachypoda* por percolação, em análise preliminar para avaliação da atividade antipromastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o extrato hidro-etanólico das folhas se mostrou mais efetivo do que os extratos do caule e raízes, com menores valores de IC₅₀ (4,85µg/mL) e IC₉₀ (14,89µg/mL), sendo o valor de IC₅₀ das folhas aproximadamente duas vezes menor do que o do caule (9,32µg/mL) e três vezes menor do que o das raízes (15,32µg/mL), e ainda, pouco maior do que o do medicamento de referência utilizada como padrão de comparação, anfotericina B (3,68µg/mL), como apresentado na Tabela 01. Estes resultados são bastante favoráveis, uma vez que as folhas representam partes renováveis da planta em estudo, sendo que a coleta das mesmas não leva, necessariamente, o vegetal a morte.

Após esta etapa preliminar, com base nos resultados obtidos contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 01), decidiu-se por utilizar o extrato das folhas para prosseguimento neste estudo bioguiado, realizando-se partição deste extrato hidro-etanólico, em escala de polaridade crescente, por partição líquido-líquido (Figura 07), obtendo-se as frações hexânica (Hx), acetato-etílica (AcEt), butanólica (But) e aquosa (Aq), nesta seqüência.

Após a partição e secagem em evaporador rotatório das frações obtidas (a fração Aquosa foi seca por liofilização), obteve-se as massas de cada fração, sendo que a fração Aquosa mostrou-se majoritária, representando 47% do extrato bruto (Br), seguida pela fração Acetato Etílica, que representa 24,25% do extrato bruto e pelas frações Butanólica e Hexânica, que representam 19,5% e 9,25% do extrato bruto, respectivamente. Assim, podemos concluir que as frações de maior polaridade representam 66,5% do extrato bruto, e as mais apolares (Hexânica e Acetato Etílica) 33,5%.

Após análise por UFLC-EM foi possível conhecer melhor o extrato Bruto e frações quanto aos seus constituintes, detectando-se a presença de 15 compostos majoritários distribuídos entre

as várias frações (Figuras 08 a 13), os quais tiveram seus espectros de massas determinados (Figura 14). Como resultado da partição, após análise de UFLC, evidenciou-se que as frações mais polares (Aquosa e Butanólica) concentraram os compostos mais polares, **01 a 08** (Figuras 11 e 12), e as frações mais apolares (Hexânica e Acetato Etfílica) os compostos de **09 a 15** (Figuras 09 e 10), estando o composto **09** presente apenas na fração Acetato Etfílica. Com base nestes resultados, espera-se uma similaridade entre os resultados das frações mais polares e das mais apolares, guardadas as devidas diferenças resultantes das concentrações de cada um dos constituintes nas diferentes frações, sendo claramente, por uma análise das áreas dos picos da Figura 13, a fração Acetato Etfílica mais rica nos compostos determinados do que a Hexânica, e a Butanólica mais rica do que a Aquosa, estando o composto **09** presente exclusivamente na fração Acetato Etfílica.

O extrato Bruto e suas frações foram então avaliadas perante promastigotas de *L. (L.) amazonensis* nas concentrações de 10 e 40 µg/mL, todos, em ambas as concentrações, apresentando efeito considerável sobre os promastigotas, com exceção da fração Aquosa (Tabela 02), que não inibiu o crescimento dos protozoários nas concentrações testadas, ficando já evidente a influência da polaridade na atividade leishmanicida, quando comparamos os efeitos na concentração de 10 µg/mL, onde podemos perceber que as frações mais apolares tendem a ter uma melhor atividade biológica no modelo *Leishmania in vitro*, podendo isto se dever a maior facilidade em transpor as membranas do parasito.

A determinação dos valores de IC₅₀ do extrato Bruto e suas frações perante promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 03) mostra a eficiência de todos eles na inibição de crescimento, com exceção da Aquosa, possivelmente devido a sua alta polaridade, tendo em vista que a membrana destes microrganismos figura como uma barreira natural, o que dificultaria a permeação de seus constituintes ativos, sobretudo dos mais polares, e também à baixa concentração de constituintes (Figura 13) presentes nesta fração. Confirmando dados da literatura (PEREIRA *et al.*, 2010), a fração Hexânica mostrou-se mais efetiva, com valor de IC₅₀ inferior a Anfotericina B (3,68 µg/mL), seguida pela Acetato Etfílica e pelo extrato Bruto que são, a um nível de significância de 5%, estatisticamente equivalentes a Anfotericina B, e depois pelas frações Butanólica e Aquosa, que apresentam apenas os constituintes de **01 a 08**. Assim, a fração

Hexânica mostrou-se mais efetiva do que a Anfotericina B (medicamento de referência) e a Acetato Etílica e o extrato Bruto tão eficientes quanto.

Uma moderada correlação de resultados, similar a encontrada nos promastigotas, manteve-se em relação aos amastigotas (Tabela 03). Considerando-se aqui, neste modelo, que além da barreira representada pela membrana da *Leishmania*, temos também a membrana do macrófago, visto que as formas amastigotas aqui avaliadas encontram-se no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos expostos às substâncias avaliadas. Os resultados de IC₅₀ obtidos nos mostram que a fração Acetato Etílica é a mais efetiva, com valor de IC₅₀ estatisticamente equivalente a fração Hexânica, sendo estas as mais efetivas tanto perante promastigotas quanto amastigotas. Este resultado possivelmente se deve a concentração dos compostos mais apolares nestas frações. Na seqüência, o extrato Bruto mostrou-se o próximo mais efetivo, pois contém as substâncias apolares evidenciadas nas frações Hexânica e Acetato Etílica (Figura 13), entretanto mais diluídas, seguido pela fração Butanólica e pela Aquosa.

Considerando o somatório das contribuições individuais de cada uma das frações para a atividade anti-amastigota (Tabela 04), pode-se dizer que há um sinergismo entre os vários constituintes, quando comparamos este somatório ao IC₅₀ do extrato Bruto, ou seja, todos juntos na concentração natural presente no extrato Bruto têm uma melhor atividade do que o somatório de suas atividades individuais. Este resultado se deve a baixa atividade biológica das frações mais polares (Butanólica e Aquosa) neste modelo e a alta proporcionalidade das frações Butanólica (19,5%) e Aquosa (47%) no extrato Bruto. Sendo, de qualquer forma, as frações Hexânica e Acetato Etílica, muito efetivas contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, tendo a Anfotericina B como padrão de comparação.

Quando avaliados quanto as suas toxicidades, o extrato Bruto e a fração Aquosa mostraram-se os menos tóxicos, com valores de CC₅₀ superiores a 160µg/mL, o que no caso da fração Aquosa se justifica pela alta polaridade e baixa concentração de seus constituintes, e no extrato Bruto, pela grande diluição dos constituintes, fruto da grande proporcionalidade, neste, das frações Aquosa e Butanólica, sendo a fração Butanólica a próxima menos tóxica, seguida pelas frações Acetato Etílica e Hexânica, respectivamente. Considerando-se dados da literatura (PEREIRA *et al.*, 2010), pode-se atribuir a maior toxicidade da fração hexânica a sua menor

polaridade, o que facilitaria aos seus constituintes transpor a barreira representada pela membrana celular.

Entretanto, quando avaliados em relação aos seus IS's, a fração Acetato Etílica mostrou-se a mais promissora, seguida pela Hexânica e Butanólica, e pelo extrato Bruto, o que faz delas importantes candidatas ao desenvolvimento de protótipos de novos fármacos, visto o alto IS apresentado por todas as amostras avaliadas, sendo o IS aceitável quando superior a 01, embora preconize-se que um bom resultado é obtido por um IS superior a 10 (PEREIRA *et al.*, 2010), a fração Acetato Etílica apresentou IS = 10,75, isso aliado ao fato de apresentar satisfatório efeito em relação as formas promastigotas e amastigotas, faz dela e de seus principais constituintes (**09 a 15**) as mais efetivas e promissoras substâncias, neste estudo, quanto a atividade leishmanicida *in vitro*. A fração Hexânica, embora tenha apresentado um IS inferior a 10 (4,22) também representa uma importante fração avaliada neste estudo, quanto a atividade leishmanicida *in vitro*, visto sua grande efetividade perante as formas promastigota e amastigota. Esta diferença de toxicidade entre as frações Hexânica e Acetato Etílica pode ser devido a maior concentração dos compostos mais apolares (**13, 14 e 15**) na fração Hexânica, em detrimento da fração Acetato Etílica, que apresenta maior proporcionalidade dos compostos **10, 11 e 12** e a exclusividade do composto **09**, ao qual pode ser atribuída, em grande parte, a ação leishmanicida hora determinada. Estes dados justificam e estimulam a continuidade dos estudos com este extrato e suas frações na busca da proposição de um mecanismo de ação para os mesmos.

Assim, estes foram avaliados quanto a inibição do *pool* de proteases (PEREIRA *et al.*, 2011) de promastigotas, em pH 8,0 (Figura 15), a fração Acetato Etílica e o extrato Bruto foram os mais efetivos, sendo seus resultados estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$), seguidos pelas frações Hexânica e Butanólica, que também mostraram-se estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$). Certamente a fração Acetato Etílica foi a mais efetiva pela presença em alta concentração dos constituintes de **09 a 15**, sobretudo do constituinte **09** e do **10 a 12**, em maior concentração nesta fração, mas também presentes no extrato bruto e na fração Hexânica. Considerando que o extrato bruto é composto em 33,5% pelas frações Hexânica e Acetato Etílica, os compostos de **09 a 12**, mesmo diluídos no extrato bruto, apresentam-se em maior concentração do que na Hexânica, sendo que este último não contém o constituinte **09**, podendo ser este o principal responsável pela atividade inibitória sobre o *pool* de enzimas de promastigotas em pH 8,0. Fato que se repete em

pH 5,0 (próximo ao pH do vacúolo fagocítico no macrófago), quando avalia-se a inibição de enzimas de amastigotas (Figura 16), onde a fração Acetato Etílica apresenta-se quase duas vezes mais efetiva do que as demais frações (Hexânica e Butanólica) e o extrato Bruto, sendo que estes três apresentam-se estatisticamente equivalentes quanto a atividade inibitória de proteases de amastigotas ($p>0,05$), assim, podemos concluir que o composto **09** tem grande atividade inibitória sobre o *pool* de enzimas extraídas de promastigotas e amastigotas, em pH 8,0 e 5,0, respectivamente (Tabela 05).

Observando a Tabela 06, podemos concluir que o sinergismo presente no extrato bruto provavelmente é fruto do erro embutido pela não determinação exata do valor de IC_{50} da fração Aquosa. Assim, pode-se dizer que não há sinergismo quanto a ação inibitória sobre o *pool* de enzimas de amastigotas (também considerando que as atividades das frações Hexânica, Butanólica e do extrato Bruto são equivalentes), fato que nos sugere, novamente, que a ação é devida, majoritariamente, a presença do composto **09**, vale ainda ressaltar que, por se tratar de um *pool* enzimático, mesmo sabendo que a maioria destas enzimas são da classe das cisteíno e serinoproteases (PEREIRA *et al.*, 2011), temos aqui muitas outras enzimas com comportamentos desconhecidos, fato que nos instiga a realizar os mesmos testes em enzimas purificadas.

As oligopeptidases são enzimas necessárias ao desenvolvimento e manutenção de doenças causadas por protozoários por estarem envolvidas na capacidade dos mesmos infectarem novas células e assim perpetuarem a infecção (MUNDAY *et al.*, 2011).

Quando avaliados quanto a inibição da oligopeptidase B (Figura 17), o extrato Bruto e suas frações apresentaram os resultados descritos na Tabela 08, sendo a fração Butanólica a mais efetiva, seguida pela Acetato-etílica e pelo extrato Bruto e fração Hexânica, que apresentaram resultados equivalentes a um nível de significância de 5%, sendo que a fração Aquosa apresentou-se também equivalente a Hexânica ($p>0,05$). Ao analisarmos estes dados, juntamente às informações fornecidas pela Tabela 08, podemos concluir que não há sinergismo entre as frações para a atividade inibitória de oligopeptidase B, e que cada uma contribui individualmente para a atividade inibitória, sendo o efeito devido a presença dos compostos mais polares, possivelmente de **01** a **08**, da fração Butanólica e do composto **09** da fração Acetato-etílica. Podemos considerar, ainda, que a fração Butanólica representa cerca de 20% do extrato Bruto, o qual tem um valor de IC_{50} cerca de 04 vezes maior do que a fração Butanólica, podemos ainda

sugerir que os compostos **03** a **08**, presentes em alta concentração na fração Butanólica, são as responsáveis pelo efeito inibitório sobre oligopeptidase B.

Quanto a oligopeptidase C (Figura 18), as frações Butanólica, Acetato-etílica e Hexânica, apresentaram os melhores resultados de inibição, sendo estes três resultados estatisticamente equivalentes entre si, considerando um nível de significância de 5% ($p > 0,05$), seguidos pelo extrato Bruto e pela fração Aquosa (Tabela 07), sendo as diferenças de IC₅₀ resultado das concentrações de moléculas, proporcional às áreas dos picos presentes, quando comparamos o extrato Bruto com as frações Hexânica, Acetato-etílica e Butanólica, sendo o IC₅₀ do extrato bruto maior devido a diluição causada pela presença da fração Aquosa em sua constituição, o que pode ser comprovado pelo resultados das contribuições individuais apresentado na Tabela 09, que evidencia a ausência de sinergismo, mostrando que as atividades individuais de cada um somadas, equivalem a atividade do extrato bruto.

Assim, as oligopeptidases B e C, que representam aqui o grupo das serino proteases, apresentam um comportamento semelhante quando expostas às substâncias avaliadas neste estudo, sendo os constituintes mais polares (fração Butanólica) mais efetivos quanto a inibição da oligopeptidase B, e com efetividade equivalente aos mais apolares (frações Hexânica e Acetato-etílica), diferentemente das cisteíno proteases avaliadas, Catepsina-L, rCPB2.8 de *L. (L.) mexicana* e suas isoformas, rCPB3.0 e rH84Y, que não apresentaram um padrão de inibição entre si (Tabelas 10 e 11).

A Catepsina-L, que mostrou-se necessária a sobrevivência de *L. (L.) mexicana* dentro de macrófagos *in vitro* (DENISE *et al.*, 2003), é uma representante do grupo das CP, que são necessárias para o parasitismo intracelular ser bem sucedido (ALVAREZ *et al.*, 2012). As CPB's que encontram-se notoriamente presentes em *Leishmania*, são enzimas do tipo Catepsina-L, a qual foi inibida (Figura 19) com menor valor de IC₅₀ pela fração Acetato-etílica, seguida pela fração Hexânica e pelo extrato Bruto (Tabela 10), o que nos sugere maior efetividade inibitória pelos constituintes de **09** a **15**, em especial ao constituinte **09**, ausente na fração Hexânica, mas presente de forma diluída no extrato Bruto.

A enzima rCPB2.8 foi melhor inibida (Figura 20), com menor valor de IC₅₀, pela fração Hexânica, seguida pela Acetato-etílica e pelo extrato bruto, sendo os valores de IC₅₀ do extrato Bruto e da fração Aquosa, assim como da fração Aquosa e Butanólica, equivalentes a um nível de

significância de 5% ($p > 0,05$) (Tabela 11). Assim evidencia-se o efeito dos constituintes mais apolares, especialmente os compostos **13**, **14** e **15**, que encontram-se mais concentrados na fração Hexânica, corroborando os resultados obtidos junto as formas promastigota e amastigota, *in vitro*, considerando que estes constituintes apresentam maior facilidade em transpor a membrana celular, podem ser os responsáveis pela inibição do crescimento do parasito *in vitro* tendo como mecanismo de ação a inibição enzimática. No *pool* de proteases, coexistem muitas outras enzimas, o que explica os altos valores de IC₅₀ quando comparados às demais frações. Já no parasito, este processo inibitório pode ser limitante de sua sobrevivência.

Analisando a Tabela 13, percebemos a ausência de sinergismo, evidenciando-se as contribuições individuais e diluição dos compostos ativos quando avaliados como extrato bruto.

Nos testes com a cisteíno protease rCPB3.0 (Figura 21), o menor valor de IC₅₀ foi obtido para a fração Aquosa (Tabela 11), o que pode ser explicado pela possível presença de algum constituinte minoritário, de alta polaridade, não identificado na análise de UFLC-EM, presente apenas nesta fração, que apresente-se altamente seletivo pela enzima, mas diluído no extrato Bruto. Ainda, analisando a Tabela 14, percebemos que, isoladamente, o somatório das atividades das frações apresentam maior atividade do que o extrato Bruto, o que caracteriza uma ausência de sinergismo entre as mesmas, e justifica o fracionamento para sua utilização, sobretudo neste caso, onde a fração Aquosa é a mais eficiente, coincidindo com os usos populares.

Referente a inibição da isoforma rH84Y (Figura 22), possivelmente a atividade inibitória se deve a presença dos constituintes mais polares (compostos **01** a **08**), independentemente de suas concentrações, estando presentes nas frações Butanólica, Aquosa e no extrato Bruto, os quais mostram-se estatisticamente equivalentes a um nível de significância de 5%. Corroborando em parte os resultados obtidos para rCPB3.0 e contrário aos obtidos para rCPB2.8, onde os constituinte apolares foram mais eficazes, demonstrando um menor valor de IC₅₀ (Tabela 11).

Considerando o impacto social e epidemiológico da Doença de Chagas, e a similaridade entre seu agente causal, o *T. cruzi*, e a *Leishmania*, avaliou-se também a atividade inibitória do extrato bruto e frações perante uma cisteíno protease típica do *T. cruzi*, a cruzaina (Figura 23). Detectando-se um menor valor de IC₅₀ de inibição para a fração Acetato Etfílica, seguida pela fração Hexânica e Aquosa (estas duas apresentando $p > 0,05$ entre si), entretanto, a fração Acetato Etfílica apresenta-se duas vezes mais ativa do que as frações Hexânica e Aquosa, o que nos sugere

uma atividade dependente dos compostos apolares da amostra, mas sobretudo do composto **09**, presente apenas nesta fração (Tabela 16).

Finalmente, avaliou-se o extrato bruto e suas frações quanto a capacidade seqüestrante de radicas DPPH (Figura 24), no intuito de detectar-se a presença ou ausência de atividade antioxidante, tendo como padrões para comparação os antioxidantes ácido ascórbico e quercetina. A detecção da ausência de atividade antioxidante significativa é um fator positivo neste estudo, pois como visa-se a obtenção de frações com atividade leishmanicida, e considerando que os macrófagos atacam os amastigotas de *Leishmania* pela produção de substâncias pró-oxidantes, a atividade antioxidante do extrato bruto ou das frações causaria um antagonismo na resposta do organismo a infecção (LINARES *et al.*, 2008).

Na ausência de um tratamento atual seguro e eficiente para a leishmaniose e para muitas outras doenças causadas por microrganismos, como a doença de Chagas, os resultados do presente estudo indicam a *A. brachypoda* como candidata a possível desenvolvimento de um novo sistema de tratamento destas doenças a partir de uma fonte natural.

7 CONCLUSÕES

Concluindo, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato bruto e suas frações, Hexânica, Acetato Etílica e Butanólica obtidos das folhas de *A. brachypoda* possuem uma promissora atividade leishmanicida perante formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sobretudo as frações mais apolares, Hexânica e Acetato Etílica, apresentando baixa toxicidade para o modelo utilizado e um alto IS, estando presentes nas mesmas os compostos de **10** a **15** e na fração Acetato Etílica o composto **09**. O fato de serem mais apolares em relação aos demais constituintes do extrato Bruto e demais frações estudadas, lhes proporcionam maior possibilidade de atravessarem a membrana citoplasmática e atuar no interior do parasito, o que foi corroborado pela melhor atividade destas frações sobre o *pool* enzimático de promastigotas e amastigotas, assim como o efeito sobre serino e cisteíno proteases isoladas (oligopeptidases B e C, rCPB2.8 e rCPB3.0). Esta ação também foi observada quanto a inibição da Catepsina-L e da Cruzaína, perante as quais a fração Acetato Etílica foi o mais eficaz. Assim, pode-se concluir que a atividade leishmanicida destas frações, e conseqüentemente de seus compostos constituintes,

pode ter como mecanismo de ação a inibição de enzimas, cruciais para a sobrevivência do parasito e desenvolvimento de sua patogenia.

A fração Butanólica apresentou-se menos efetiva sobre promastigotas e amastigotas, sendo também a de menor toxicidade determinada, o que acredita-se ser fruto de sua maior polaridade, com a presença dos constituintes **01** a **08**, também mais polares, tendo estes maior dificuldade em atravessar a membrana celular para exercer atividade biológica, o que faz dele menos efetivo perante o parasito e também menos tóxico. Uma vez que a membrana celular deixe de figurar como uma barreira, estes constituintes passam a ter acesso ao conteúdo intracelular do parasito, podendo agora exercer sua atividade inibitória, o que pode ser detectado pelo efeito da fração Butanólica na inibição das oligopeptidases B e C, assim como da rH84Y.

Assim, os resultados sugerem que a atividade leishmanicida apresentada pode estar associada a inibição de proteases das leishmanias, que são aparatos químicos essenciais a sobrevivência do parasito. O fato do extrato bruto e frações não apresentarem efeito antioxidante, o que impede uma interferência negativa sobre a atividade biológica natural do macrófago sobre as formas amastigotas intracelulares, não antagonizando o efeito do organismo sobre o parasito, confere às substâncias estudadas pré-requisitos para serem vistas como potenciais compostos para obtenção de novos candidatos a modelos químicos (semi-sintéticos ou sintéticos) no desenvolvimento de novos fármacos eficazes e menos tóxicos para o tratamento de doenças parasitárias como a Leishmaniose e a doença de Chagas, considerado o importante efeito detectado sobre a cruzáina neste estudo e as muitas similaridades entre o *T. cruzi* e a *Leishmania*, sendo ainda necessária uma detalhada avaliação quanto aos mecanismos de ação dos seus principais compostos presentes nas amostras estudadas, assim como uma avaliação de sua toxicidade *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, M. A. *et al.* Comparison of new and old-world leishmanins in an endemic region of Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 5, p. 1292-1297, 1995.
- AGOSTINI, F. *et al.* Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Rev Bras Farmacog.**, v.15, p. 215-220, 2005.
- ALCERITO, T. *et al.* Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochem. System. and Ecol.**, v. 30, p. 677–683, 2002.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J. Immun.**, v. 161, p. 6794–6801, 1998.
- ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Bioch. Biof. Acta**, v.1824, p. 195-206, 2012.
- ALVES, L. C. *et al.* S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. **Eur. J. of Biochem.**, v. 268, p. 1206-1212, 2001.
- APARÍCIO, I. M. *et al.*, A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infect. Immun.** v.72, p. 5892–5902, 2004.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Inter. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- ASSIS, D. M. *et al.* Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, *on line*, p. 1-10, 2012.
- BAILY, G. C.; NANDY, A. Visceral leishmaniasis: more prevalent and more problematic. **J. Infect.**, v. 29, n. 3, p. 241-247, 1994.
- BALANA-FOUCE, R. *et al.* The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 3, p. 241-247, 1998.
- BARATA, L. E. S. *et al.* Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589–595, 2000.

- BARBOSA, W. L. R. *et al.* *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Braz J. Pharmacogn.** v. 18, n. 4, p. 142-150, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativa e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.
- BARRETT M. P. *et al.* The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, p. 1469–1480, 2003.
- BART, C.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Isolation of *lmcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. **Mol. & Biochem. Parasitol.**, v. 73, n. 12, p. 271-274, 1995.
- BASSELIN, M. *et al.* Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 3731-3738, 2002.
- BERASAIN, P. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 130, p. 23–29, 2003.
- BERMAN, J. D. *et al.* Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine macrophage tumo cells. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 20, n. 1, p. 85-92, 1986.
- BERN, C. *et al.* Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 917–924, 2006.
- BHATTACHARYA, S. K. *et al.* Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 2, p. 217-221, 2004.
- BHATTACHARYA, S. K. *et al.* Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 4, p. 591-598, 2007.
- BILLO, M. *et al.* Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **J. Ethnopharmacol.** v. 96, p. 569–575, 2005.
- BOLZANI, V. S. *et al.* Cosntituíntes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Quím. Nova**. v. 26, p. 641-643, 2003.
- BONTEMPI, E. *et al.* Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 77, p. 599–604, 1984.
- BORROSO, G.M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, v. 3, Vicosa, Brasil, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA. Disponível em <URL:http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/ecossistemas/cerrado/index_html/>

mostra_documento> [20/10/2004].

BRAY, P. G. *et al.* Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BRYCESON, A. Visceral leishmaniasis in India. **Lancet.**, v. 356, p. 1399, 2000.

BURLEIGH, B. A. *et al.* A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **J. Cell Biol.** v.136, p. 609–620, 1997.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiol.**, v. 4, p. 701–711, 2002.

BUXBAUM, L. U. *et al.* Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. **The J. of Immunol.**, v. 171, p. 3711–3717, 2003.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, 2003.

CAZZULO, J. J. *et al.* Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1037, p. 186–191, 1990.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRIGUES, L. M., Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.** v. 18, p. 674–688, 2001.

CHANG, K. P. *et al.* *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, p. 375–390, 2003.

COELHO, A. C. *et al.* Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 3030-3032, 2007.

COETZER, T. H. T.; GOLDRING, J. P. D.; HUSON, L. E. J., Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis. **Biochimie**, v. 90, p. 336–44, 2008.

CONSEIL, V.; SOETE, M.; DUBREMETZ, J. F. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46, p. 1358–1361, 1999.

COOMBS, G. H.; BAXTER, J. Inhibition of *Leishmania* amastigote growth by antipain and leupeptin. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 78, p. 21-24, 1984.

COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Proteases in trypanosomatids. In: Hide, G. *et al.* **Trypanosomiasis and leishmaniasis**. London: CAB International, 1997. p 176–197.

COSTA, P. R. C.; LIMA, E. A. Brazilian-Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Rio de Janeiro, 1989.

CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H.. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.19, p. 111–126, 2006.

CROFT, S. L. ; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 1478–1483, 2011.

DeCLERCK, Y. A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. J. of Cancer.**, v. 36, p. 1258-1268, 2000.

Del Nery, E. *et al.* Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 25713–25718, 1997.

DELORENZI, J. C. *et al.* Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1349–1354, 2001.

DENISE, H. *et al.* Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence *in vivo*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 60, p. 3190-3195, 2003.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DIAZ, N. L. *et al.* Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Clin. and Experimental Dermatol.**, v. 28, n. 3, p. 288-93, 2003.

EAKIN A. E., *et al.*, The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzin) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 7411–7420, 1992.

FERREIRA, M. E. *et al.* Desmatamentos no bioma Cerrado: uma análise temporal (2001-2005) com base nos dados MODIS – MOD13Q1. *Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR)*, Florianópolis, Brasil, 2007.

FREITAS-JUNIOR, L. H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int. J. Parasit.: Drug Drug Resist.**, v. 2, p. 11-19, 2012.

FREZARD, F. *et al.* Novel methods for encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 841–846, 2000.

- FREZARD, F. *et al.* Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.
- GAZANION, E. *et al.* The *Leishmania* nicotinamidase is essential for NAD⁺ production and parasite proliferation. **Mol. Microbiol.**, v. 82, p. 21–38, 2011.
- GAZANION, E. *et al.* *Leishmania infantum* nicotinamidase is required for late-stage development in its natural sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus*. **Int. J. Parasit.**, v. 42, p. 323-327, 2012.
- GONZALEZ, J. *et al.* Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. **J. Exp. Med.**, 184, p. 1909-1918, 1996.
- GONZALEZ, J. *et al.* Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. **Eur. J. of Biochem.**, v. 264, p. 897-904, 1999.
- GRIMALDI, G. J.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras.**, v. 17, p. 561-584, 2003.
- HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 7, p. 1689-1694, 1998.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.
- HARTH, G. *et al.* Peptide- fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 58, p. 17-24, 1993.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.
- HUA, S. *et al.* Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, v. 78, p. 33-46, 1996.
- ILG, T. *et al.* Distribution of parasite cysteine proteinases in lesions of mice infected with *Leishmania mexicana* amastigotes. **Mol. & Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 2, p. 193-203, 1994.
- ITOW, S.; CAMARGO, E. P. Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, v. 24, p. 591–595, 1977.

- JORGE, M. P. *et al.* Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, p. 361–366, 2008.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 439-445, 2006.
- KAYE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews**, v. 9, p. 604-615, 2011.
- KAYSER, O. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 76, p. 131–138, 2000.
- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 2, p. 177–185, 2010.
- KHAW, M.; PANOSIAN, C. B. Human antiprotozoal therapy: past, present and future. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 427-439, 1995.
- KLEMBBA, M., GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Ann. Review of Biochem.**, v. 71, p. 275–305, 2002.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Evolution, classification and geographical distribution**, p. 1-120.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 94-105, 1992.
- LANIADO-LABORIN, R.; VERGAS M. C. Amphotericin B: Side effects and toxicity. **J. Rev. Iberoam. Microl.**, v. 26, p. 223-227, 2009.
- LEITE, J. P. V. *et al.* Trypanocidal Activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivatives. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 11, p. 2307—2309, 2006.
- LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic by *Leishmania mexicana mexicana*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, p. 327-336, 1974.
- LEWIS, D. J.; WARD, R. D. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Transmission and vectors**, p. 235-262.
- LIMA, E. B. *et al.* Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, p. 111-24, 2007.
- LINARES, E. *et al.* Inhibition of *in vivo* leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 44, p. 1668-1676, 2008.

- LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitol.**, v. 32, p. 161-259, 1993.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras I*, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: Nova Odessa, 1988.
- MAEKAWA, Y. *et al.* Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with Cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 161, p. 2120-2127, 1998.
- MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTASKI, W. A. Parasitologia Médica. In: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. **Outros Protozoários que Habitam o Sangue e os Tecidos**, p. 115-176.
- MARTIN, M. B. *et al.* Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosome brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J. Med. Chem.** v. 44, n. 6, p. 906-916, 2001.
- MARTIN, F. *et al.* Antioxidant C-Glucosylxanthones from the Leaves of *Arrabidaea patellifera*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1887-1890, 2008.
- MCKERROW, J. H. *et al.* The proteases and the pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual Review Microbiol.**, v. 47, p. 821-853, 1993.
- MCKERROW, J. H.; MCGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasitic drug design. **Parasitol. Today**, v. 11, p. 279-282, 1995.
- McCONVILLE, M. J. *et al.* Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 368-375, 2007.
- McLUSKEY, K. *et al.* Crystal Structure of *Leishmania major* Oligopeptidase B Gives Insight into the Enzymatic Properties of a Trypanosomatid Virulence Factor. **J. of Biol. Chem.**, v. 285, p. 249-59, 2010.
- MEHEUS, F. *et al.* Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. 803-818, 2010.
- MELO, R. L. *et al.* Synthesis and hydrolysis by cysteine and serine proteases of short internally quenched fluorogenic peptides. **Anal. Biochem.**, v. 293, p. 71-77, 2001.
- MICHELS, P. A.; AVILÁN, L. The NAD⁺ metabolism of *Leishmania*, notably the enzyme nicotinamidase involved in NAD⁺ salvage, offers prospects for development of anti-parasite chemotherapy. **Mol. Microbiol.**, v. 82, p. 4-8, 2011.

- MILTON N. S. *et al.* Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados. **Quím. Nova.** v. 26, p. 407-416, 2003.
- MOLYNEUX, H. D.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Morphology, ultrastructure and life cycles**, p. 551-582.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007. 2ed, Brasília, DF.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos baseado em Produtos Naturais. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MOTTRAM, J. C. *et al.* Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 93, p. 6008–6013, 1996.
- MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 455–460, 1998.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiol.**, v. 7, p. 375–381, 2004.
- MUNDAY, J. C. *et al.* Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 175, p. 49–57, 2011.
- MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A. S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC Mol. Biology**, v. 6, p. 3, 2005.
- MURRAY, H. W.; TEITELBAUM, R. F. L. Arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. **Braz. J. of Infect. Dis.**, v. 165, n. 3, p. 513-7, 1992.
- MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The J. of Experim. Medicine**, v. 189, n. 4, p.741-746, 1999.
- MURTA, A. C. *et al.* Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 43, p. 27–38, 1990.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

- PANARO, M. A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **Int. J. of Clin. and Laboratory Research**, v. 29, n. 3, p. 122-127, 1999.
- PAULETTI, P. M. *et al.* New Antioxidant C-Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1384-1387, 2003.
- PEARSON, R. D. *et al.* Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1994-1999, 1983.
- PEREIRA, I. O. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomed.** v. 17, p. 339-345, 2010.
- PEREIRA, I. O. *et al.* Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania*'s proteases inhibitors. **J. Med. Food.**, v. 14, p. 557-562, 2011.
- PEREZ VICTORIA, F. J. *et al.* Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, v. 9, n. 1-2, p. 26-39, 2006.
- PETERS, N. C. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.
- POSER, G. L. V. *et al.* The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 28, p. 351-366, 2000.
- POWERS, J. C. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chem. Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.
- RAKOTOMANGA, M. *et al.* Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.
- RAVDIN, J. I. Principles and Practice of Infectious Diseases. In: New York: Churchill Livingstone, 1990. cap. **Protozoal Diseases**, p. 2035-2130.
- ROBERTSON, C. D. The *Leishmania mexicana* proteasome. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, v. 103, p. 49-60, 1999.
- ROCHA, C. Q. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **J. Ethnopharm.**, v. 133, p. 396-401, 2011.
- RODRIGUES, N. *et al.* Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the biphosphonate pamidronate. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 138-140, 2002.

- ROGGWILLE, E. *et al.* A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp 76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 82, p. 13–24, 1996.
- ROSENTHAL, P. J. Identification of three stage-specific proteinases from *Plasmodium palcifarum*. **J. Exp. Med.**, v. 166, p. 816-821, 1987.
- ROSENTHAL, P. J. Proteases of protozoan parasites. **Adv. Parasitol.**, v. 43, p. 105–159, 1999.
- SADIJ, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 1–21, 2002.
- SANDERSON, S. J. *et al.* Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **Biochem. J.**, v. 347, p. 383-388, 2000.
- SANO, E. E. *et al.* Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesq. agropec. bras.** v. 43, p. 153-156, 2008.
- SAUVAIN, M. *et al.* Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). **Phytother. Res.**, v. 10, p. 1–4, 1996.
- SCHARFSTEIN, J. *et al.* Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1289–1300, 2000.
- SCHWARTZ, E.; HATZ, C. ; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 342-349, 2006.
- SEGUNDO, B. S. Role of proteolytic enzymes in specific developmental processes in plants. AVILÉS, F. X. **Innovations in protease and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 349-367, 1993.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.
- SILVA-LOPEZ, R. E. *et al.* Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 101, p. 1627-1635, 2007.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**: Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2003, p.291-320.
- SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 2067-2075, 2004.

SINGH, N.; SINGH, R.; SUNDAR, S. Novel mechanism of drug resistance in kala-azar field isolates. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 4, p. 600-607, 2003.

SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. **Indian. J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 331-344, 2006.

SINGH, N. *et al.* Antileishmanial activity *in vitro* and *in vivo* of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. **Parasitol. Res.**, v. 103, p. 351-354, 2008.

SINGH, N. *et al.* Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drugs targets. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, p. 485-497, 2012.

SOARES, M. J. *et al.* Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Sci.**, v. 102, p. 157-167, 1992.

SOUZA, G. F. *et al.* Leishmanicidal activity of primary s-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxid.**, v. 15, n. 3, p. 209-216, 2006.

SUNDAR, D. *et al.* Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 3, p. 193-196, 2001.

SUNDAR, S. *et al.* Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, p. 2571-2581, 2007.

THALHOFER, C. J. *et al.* Leukocytes infiltrating the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. **Infect. Immun.** v. 79, p. 108-117, 2010.

TO, W-Y.; WANG, C. C. Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. **FEBS Letters**, v. 404, p. 253-262, 1997.

TOPAA, R. H. 1998. Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. Brasil. 2008.

TORRES-SANTOS, E. C. *et al.* Selective effect of 20,60-di-hydroxy-40-methoxy chalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology.**, v. 114, p. S91-S99, 1997.

VANNUCCHI, H. *et al.* Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Nutri. Clín.**, v. 31, p. 31-44, 1999.

VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Ca^{2+} transport by digitonin- permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and wr-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochem. J.**, v. 284, n. 2, p. 463-467, 1992.

VIEGAS, Jr. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

YEN, W. J.; CHANG, L.; DUH, P. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 193-200, 2005.

YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. **Acta Trop.** v. 57, p. 307–315, 1994.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 449-470, 1994.

ZORN, B. *et al.* 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochem.** v. 56, p. 831, 2001.

WHO, 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Press, Geneva, Switzerland.

WILLIAMS, E. J. Medical parasitology a practical approach. In: . New York: Oxford University Press, 1995. cap. *Leishmania and Trypanosoma*, p. 151-176.