

**Busca de atividade leishmanicida de extrato, frações e
subfrações obtidas da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC**

Esther Della Nina Sahid

Araraquara -SP
2012

Busca de atividade leishmanicida de extrato, frações e subfrações obtidas da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC

Esther Della Nina Sahid

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Aparecida Silva Graminha

Co-orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Agradecimentos

Aos meus pais, Vander e Evany, pelo amor, carinho, apoio, ensinamentos, conselhos e por sempre me incentivarem a seguir em frente.

À Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha, pela orientação, dedicação, paciência e disposição em ensinar sempre que preciso.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, pelo apoio e pela colaboração durante todo o tempo.

À Isabel Martinez, por todos os ensinamentos, pela ajuda, dedicação, paciência e amizade imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Aline Rimoldi Ribeiro, pelos ensinamentos, pela ajuda, amizade e disposição demonstrada durante todo o tempo.

À Josiane Clarice Claudino, pelos ensinamentos, pela colaboração, ajuda, paciência e disposição.

A todos os amigos que me acompanharam e compartilharam momentos inesquecíveis ao longo destes cinco anos, em especial, às repúblicas Benzaminas e Paracetamal.

Sumário

Resumo

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Siglas e Abreviaturas

1.Introdução	10
1.1. Histórico	11
1.2. Epidemiologia.....	12
1.3. Agente etiológico e vetor.....	16
1.3.1. Metacicloênese	20
1.4. Modo de transmissão	21
1.5. Aspectos clínicos	21
1.6. Terapia medicamentosa das leishmanioses	23
1.7. Uso de produtos naturais	27
1.7.1. <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	30
1.8. Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação de atividade leishmanicida	34
2. Desenvolvimento	36
2.1. Justificativa.....	36
2.2. Objetivos.....	37
2.3. Materiais e Métodos	38
2.3.1. Material.....	38
2.3.1.1. Meios, soluções e reagentes.....	38
2.3.1.2. Equipamentos e utensílios	38
2.3.1.3. Material Vegetal	39
2.3.1.4. Cepa padrão	40
2.3.2. Metodologia.....	40
2.3.2.1. Obtenção do extrato e de suas frações e subfrações.....	40
2.3.2.2. Preparo do extrato e de suas frações e subfrações.....	44
2.3.2.2.1. Solução estoque do extrato, frações e subfrações.....	44
2.3.2.2.2. Preparo da suspensão de leishmanias	44
2.3.2.3. Bioensaios para a determinação da atividade leishmanicida (promastigotas).....	44
2.3.2.4. Avaliação da citotoxicidade de compostos ativos frente a macrófagos da linhagem J774 pela técnica colorimétrica do MTT	47

3. Resultados	49
3.1. Obtenção do extrato, frações e subfrações da planta <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	49
3.2. Atividade do extrato, frações e subfrações da planta <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	55
3.3. Atividade de subfrações da planta <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC frente a macrófagos da linhagem J774.....	57
4. Discussão	58
5. Conclusão	65
6. Referências Bibliográficas	67

Resumo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), leishmanioses são antropozoonoses e estão entre as seis doenças tropicais de maior importância no Velho Mundo e nas Américas. São endêmicas em 88 países e estima-se que sua prevalência seja de 12 milhões de casos no mundo. Nas duas últimas décadas, o número de casos tem aumentado, assim como sua ocorrência geográfica. No Brasil, é uma realidade em diversos estados, apresentando perfis epidemiológicos diferentes. A terapêutica empregada atualmente conta com poucos fármacos, em uso há mais de 40 anos, e que apresentam potencial nefro, hepato e cardiotoxico. Além disto, são contraindicados a idosos e gestantes, o que caracteriza mais um entrave à terapêutica atual. Tendo em vista a imensa biodiversidade brasileira, uma fonte alternativa para o tratamento destas e outras inúmeras enfermidades é a busca de novas moléculas por meio da pesquisa com extratos vegetais e seu fracionamento, a partir de diferentes espécies de plantas. Este trabalho avaliou a atividade leishmanicida do extrato acetato de etila, frações e subfrações obtidas da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC sobre a espécie *Leishmania amazonensis*. Os ensaios biológicos foram realizados *in vitro* pelo método colorimétrico de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) utilizando formas promastigotas do parasito e macrófagos da linhagem J774, para estudos de citotoxicidade. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando-se microplacas de 96 orifícios. Como resultado, três frações ($CI_{50} = 23,56 \mu\text{g/mL}$; $29,89 \mu\text{g/mL}$; $42,31 \mu\text{g/mL}$) e cinco subfrações ($CI_{50} < 1,56$ e $CI_{50} = 5,07 \mu\text{g/mL}$; $5,21 \mu\text{g/mL}$; $24,61 \mu\text{g/mL}$) apresentaram interessante potencial leishmanicida, sendo que duas destas subfrações também demonstraram baixa citotoxicidade ($IS = 64,1$). A partir de análises cromatográficas das frações e subfrações citadas e evidências baseadas na literatura, sugere-se que o ativo responsável por tal atividade pertença a um grupo fenólico. Para identificação da substância ativa será necessário realizar, numa próxima etapa, processos de purificação, isolamento e caracterização.

Lista de Ilustrações

FIGURA 1. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo.....	13
FIGURA 2. Distribuição geográfica das leishmanioses cutânea e mucocutânea no Novo Mundo.....	14
FIGURA 3. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo segundo a espécie <i>L. tropica</i> , e espécies relacionadas, e a espécie <i>L. aethiopica</i>	14
FIGURA 4. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo segundo a espécie <i>L. major</i>	14
FIGURA 5. Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	18
FIGURA 6. <i>Leishmania</i> – forma flagelada ou promastigota.	18
FIGURA 7. <i>Leishmania</i> – forma aflagelada ou amastigota presente no interior de macrófagos.	18
FIGURA 8. Aspectos macro e microscópicos da <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC.	32
FIGURA 9. <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC.	33
FIGURA 10. Fluxograma do processo de obtenção do extrato seco AcOEt.	42
FIGURA 11. Fluxograma do processo de obtenção das frações e subfrações.	43
FIGURA 12. Esquema ilustrativo da montagem da placa de 96 orifícios utilizada nos bioensaios. ...	45
FIGURA 13. Fluxograma do processo realizado para avaliação da citotoxicidade das amostras selecionadas.....	48
FIGURA 14. Cromatoplaça das frações obtidas por EFS.	51
FIGURA 15. Cromatoplaça das SubFr. 1 a 49 (CC).	52
FIGURA 16. Cromatoplaça das SubFr. 57 a 149 (CC).	52
FIGURA 17. Cromatograma do extrato AcOEt de <i>B. trimera</i> em 210 nm e espectro UV do pico principal.....	54
FIGURA 18. Cromatograma da SubFr 148 da CC em 350 nm e espectro UV do pico principal.	54
FIGURA 19. Esquema de placa de 96 orifícios após o ensaio colorimétrico de MTT.	57
FIGURA 20. Estrutura de algumas substâncias que apresentaram potencial leishmanicida, segundo a literatura.	64

Lista de Tabelas

TABELA 1. EXTRATO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES TRIADOS SOBRE <i>Leishmania amazonensis</i>	40
TABELA 2. DADOS DA EFS: FRAÇÕES, ELUENTES E MASSA (g) DAS FRAÇÕES.	50
TABELA 3. DADOS DA CC: FRAÇÕES, ELUENTES E MASSA (g) DAS SUBFRAÇÕES	51
TABELA 4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (CI ₅₀) EM EXPERIMENTOS SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i>	56
TABELA 5. CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA DE 50% (CC ₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) PARA BIOENSAIO REALIZADO COM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774.	58

Lista de Siglas e Abreviaturas

AcOEt: Acetato de Etila

CC: Cromatografia em Coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CI₅₀: Concentração Inibitória de 50%

CC₅₀: Concentração Citotóxica de 50%

CLAE-UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com luz UV

DMSO: Dimetilsulfóxido

EFS: Extração em Fase Sólida

Fr.: Fração

HCl: Ácido clorídrico

Hex: Hexano

i-PrOH: Isopropanol

IS: Índice de Seletividade

LIT: Liver Infusion Tryptose

MeOH: Metanol

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NP/PEG –UV: Reagente Polietilenoglicol

OMS: Organização Mundial da Saúde

PMS: Fenazina metassulfato

SFB: Soro Fetal Bovino

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SubFr.: Subfração

UV: Ultravioleta

1. Introdução

Doenças infecciosas podem ser consideradas negligenciadas quando existe falta de acessibilidade, efetividade e facilidade no uso de medicamentos para o tratamento adequado. Este é o caso das leishmanioses. Em países em desenvolvimento, a maioria da população é pobre e, portanto, não tem condições de arcar com os custos do tratamento, tornando a situação ainda pior, devido ao descaso com estas doenças (YAMEY, TORREELE, 2002). Atualmente, são conhecidos aproximadamente 25 compostos com atividade leishmanicida, mas poucos deles são utilizados em humanos e a maioria é de administração parenteral (SINGH, SIVAKUMAR, 2004), caracterizando um entrave à terapêutica. Os fármacos mais utilizados são os antimoniais pentavalentes, como medicamentos de primeira escolha. Apesar de causarem uma série de efeitos adversos, gerando desconforto aos pacientes, eles continuam a ser o método mais barato para o tratamento das leishmanioses em países em desenvolvimento (SINGH, SIVAKUMAR, 2004). Pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosina são utilizados, principalmente, em casos de resistência aos antimoniais. Mas apesar de serem eficazes contra diversas espécies de leishmanias, não apresentam índices terapêuticos favoráveis e causam importantes reações adversas (CUNHA *et al.*, 2011). Além dos casos de resistência aos antimoniais pentavalentes e também à pentamidina, a ausência de agentes leishmanicidas seguros, o tratamento falho e as recaídas em pacientes com co-infecção HIV-*leishmania* caracterizam alguns dos desafios atuais no tratamento destas doenças (SUNDAR, RAI, 2002). Frente a este quadro, justifica-se a busca por novas substâncias com atividade leishmanicida, mais eficazes e menos tóxicas, para o tratamento das leishmanioses, principalmente, entre as fontes naturais, haja vista a grande quantidade de espécies nativas da flora brasileira de valor medicinal (CORADIN *et al.*, 2011).

1.1. Histórico

As leishmanioses, também denominadas Calazar, em casos de leishmaniose visceral, ou botão do Oriente, em casos de leishmaniose cutânea no Velho Mundo, datam do século I d.C: foram encontrados em peças de cerâmica pré-Inca do Peru e Equador, nas quais foram representadas lesões cutâneas e deformidades na face, possivelmente, associadas às leishmanioses cutânea e mucocutânea (CARVALHO, FERREIRA, 2001). Pedro Pizarro, em 1571, relatou a ocorrência de uma doença que desfigurava o nariz em povos dos vales quentes do Peru. Somente no final do século XIX, Cunningham, em 1885 (RATH *et al.*, 2003), descreveu formas amastigotas do parasito em casos de Calazar, na Índia, iniciando a descoberta dos agentes etiológicos das leishmanioses. Borovisky, em 1898 (RATH *et al.*, 2003), demonstrou que o agente etiológico do Botão do Oriente era um protozoário. E, em 1903, Leishman e Donovan descreveram pela primeira vez o protozoário responsável pelo Calazar indiano. Também neste ano, Wright descreveu o parasito, causador do Botão do Oriente, conhecido hoje com *Leishmania tropica* (RATH *et al.*, 2003).

No Brasil, foi identificada pela primeira vez a presença do botão endêmico dos países quentes, conhecido como “Botão da Bahia”, por Moreira em 1895. Lindenberg, em 1909, encontrou, em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos, construindo rodovias no interior de São Paulo, o parasito causador das leishmanioses, confirmando a presença de suas formas em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas. Em 1911, foi diagnosticada por Splendore a forma mucosa da doença, sendo Gaspar Vianna o responsável por nomear o parasito de *Leishmania braziliensis* (BRASIL, 2010). No ano seguinte, em 1912, Gaspar Vianna divulgou, no VII Congresso Brasileiro de Medicina, o primeiro tratamento para a leishmaniose tegumentar, que fazia uso do tártaro emético por via endovenosa. Este fármaco, que durante muitos anos foi rejeitado pela medicina devido à sua elevada toxicidade, salvou milhões de vidas, trazendo benefícios globais para a saúde e economia das populações

perseguidas por esta doença. Tal descoberta, juntamente com outros inúmeros feitos, entre eles o esclarecimento do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e a descrição sobre a anatomia patológica da Doença de Chagas, colocaram o médico Gaspar Vianna entre os mais altos expoentes da medicina brasileira (REY, 1962). Já em 1922, foi demonstrado por Aragão, pela primeira vez, o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar e, em 1958, Forattini identificou em áreas do Estado de São Paulo roedores silvestres parasitados. Deste período em diante, a transmissão destas doenças tem sido descrita em diversos municípios de todas as unidades federadas (UF) do país. (BRASIL, 2010).

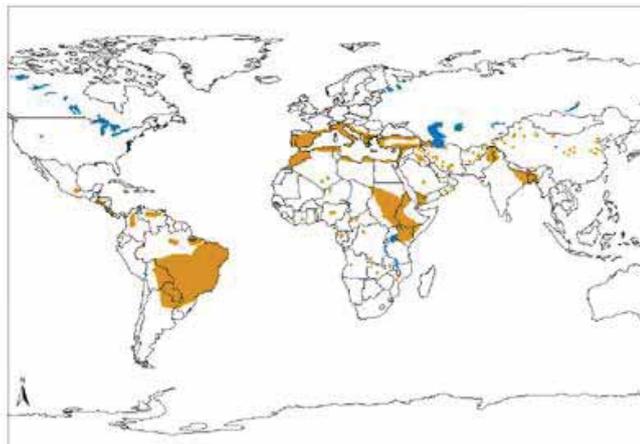
1.2. Epidemiologia

Segundo a OMS, a prevalência mundial das leishmanioses é de 12 milhões de casos, com mortalidade de cerca de 60.000 casos por ano. A população em risco está estimada em 350 milhões de pessoas. Apesar dos números, os casos de leishmanioses têm sido subestimados anualmente. Estima-se que ocorram de 1,5 a 2 milhões de novos casos a cada ano, mas apenas 600.000 são declarados oficialmente (WHO, 2012). As leishmanioses podem ser consideradas doenças reemergentes e tem sido preocupante o aumento de sua incidência, principalmente nas últimas décadas, em certas partes do mundo (GOTO, LINDOSO, 2010). Isto tem ocorrido devido a múltiplos fatores, entre eles a epidemia de AIDS, o que leva à presença de co-infecção HIV-*leishmania*; o maior número de viagens internacionais, além da constante migração de pessoas das áreas rurais para áreas urbanas; a falta de vacinas eficazes (não existe ainda nenhuma vacina eficaz contra qualquer forma de leishmaniose); as dificuldades no controle dos vetores; os conflitos internacionais e o desenvolvimento de resistência à terapêutica disponível (SERENO *et al.*, 2007). As principais áreas de prevalência destas doenças são as regiões tropicais e subtropicais, no entanto, com o aumento da

movimentação de pessoas pelo mundo, principalmente pelo aumento do número de viagens, elas também tem aparecido em áreas não endêmicas (GOTO, LINDOSO, 2010).

A leishmaniose tegumentar é prevalente em 82 países e sua incidência está estimada em 1,5 milhões de casos por ano. Mais de 90% dos casos são relatados na África (principalmente no Marrocos, Etiópia e Tunísia), no Oriente Médio (principalmente no Afeganistão, Paquistão, Irã, Síria e Arábia Saudita) e América Latina (principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) (GOTO, LINDOSO, 2010). Entre estes países, ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru, 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea e, no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, ocorrem 90% dos casos de leishmaniose cutânea. Quanto à leishmaniose visceral, 90% dos casos são relatados em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão. No Brasil, a forma visceral da doença está presente em 17 estados espalhados entre as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (RATH *et al.*, 2003).

FIGURA 1. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo.



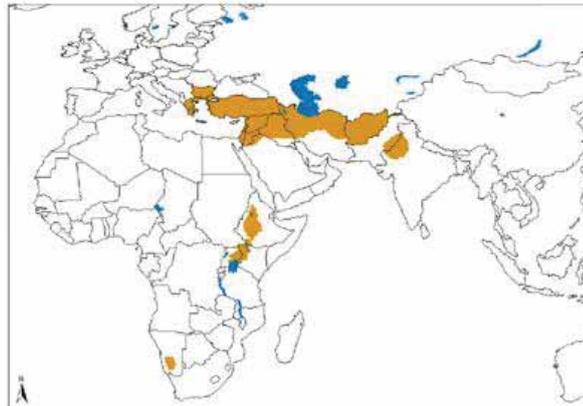
FONTE: WHO (2012).

FIGURA 2. Distribuição geográfica das leishmanioses cutânea e mucocutânea no Novo Mundo.



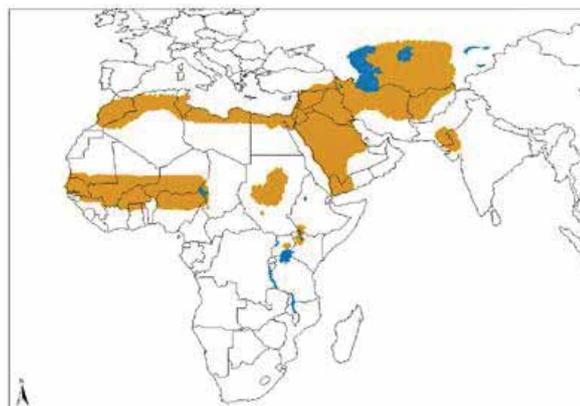
FONTE: WHO (2012).

FIGURA 3. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo segundo a espécie *L. tropica*, e espécies relacionadas, e a espécie *L. aethiopica*.



FONTE: WHO (2012).

FIGURA 4. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no Velho Mundo segundo a espécie *L. major*.



FONTE: WHO (2012).

A leishmaniose tegumentar americana apresenta grande magnitude no Brasil e, por isto, merece maior atenção entre outras afecções dermatológicas. Esta doença está presente em todas as regiões brasileiras, demonstrando sua ampla distribuição no país, e apresenta intensa concentração de casos em algumas áreas e casos isolados em outras. Na década de 80, o número de casos brasileiros aumentou e de 1985 a 2005, o coeficiente médio de detecção foi de 18,5 casos/100.000 habitantes, verificando-se coeficientes mais elevados em 1994 e 1995, com níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Tal doença acomete ambos os sexos e todas as faixas etárias, sendo que, em média, predomina em maiores de 10 anos (90%) e no sexo masculino (74%) (BRASIL, 2010).

A disseminação da AIDS, principalmente entre as camadas mais pobres da população, e a urbanização crescente da leishmaniose visceral são fatores que favorecem o aumento da prevalência da co-infecção HIV-*leishmania* (RATH *et al.*, 2003) e caracterizam uma das principais ameaças para o controle desta forma de leishmaniose. Na Europa, especialmente no sul, até 70% dos casos em adultos de leishmaniose visceral estão relacionados com a infecção por HIV. Ambas as doenças se reforçam mutuamente, ou seja, pacientes infectados com HIV são particularmente susceptíveis a leishmaniose visceral e esta, acelera a replicação viral e a progressão da AIDS (WHO, 2012). A interação HIV-*leishmania* ainda não foi totalmente elucidada, no entanto, acredita-se atualmente, que protozoários do gênero *Leishmania* atuem como cofatores nas infecções por HIV. Ambos patógenos invadem os mesmos tipos celulares, como macrófagos e células dendríticas, acarretando importantes efeitos na resposta imune do hospedeiro e influenciando os mecanismos biológicos de ambos os microrganismos. O aumento da replicação viral e da progressão da AIDS se deve à presença de moléculas de lipofosfoglicana (LPG) na superfície dos parasitos do gênero *Leishmania* e a outros mensageiros secundários intracelulares, como a proteína tirosina quinase e proteína quinase

A, que estimulam a indução da replicação viral pela LPG (ZHAO *et al.*, 2004; OLIVIER *et al.*, 2003).

Atualmente, 35 países em todo o mundo relataram casos de co-infecção HIV-*leishmania* (WHO, 2012). De 1985 a 2000, esta doença acometeu 422,5 mil pessoas no Brasil e nos dois anos seguintes foram identificados 66,8 mil novos casos, que não foram controlados. Entre 1999 e 2001, só no Estado de São Paulo, foram registrados 87 casos de leishmaniose visceral, sendo que em sete deles a doença levou os pacientes a óbito (RATH *et al.*, 2003).

1.3. Agente etiológico e vetor

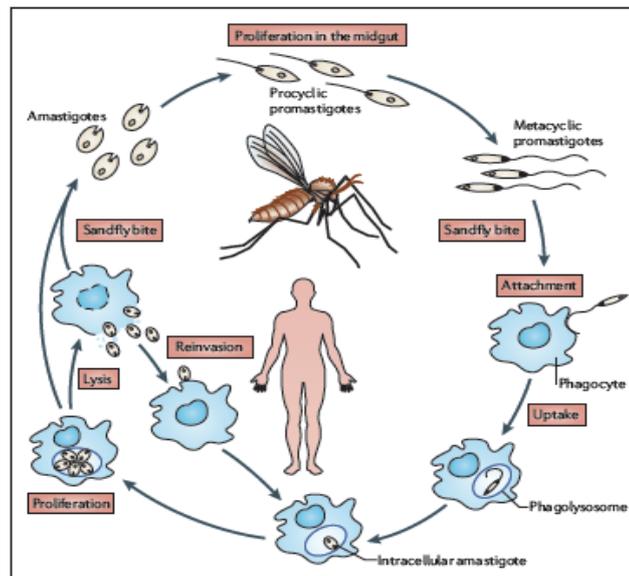
O gênero *Leishmania* pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. A diferença nos padrões de desenvolvimento dos parasitos nos hospedeiros invertebrados naturais divide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Vianna* e *Leishmania* (RATH *et al.*, 2003). Formas promastigotas dos parasitos pertencentes ao subgênero *Vianna* se desenvolvem nos hospedeiros invertebrados em regiões limitadas ao intestino nas porções média e anterior. No subgênero *Leishmania*, além de formas promastigotas, aparecem neste hospedeiro formas paramastigotas (forma com flagelo curto) que se encontram aderidas, pelo flagelo, às paredes intestinais (piloro e/ou íleo) por meio de hemidesmossomos, diferentemente, das promastigotas que migram do intestino posterior para as regiões média e anterior (MICHALICK, 2005). Além das formas flageladas citadas anteriormente, este protozoário apresenta ainda outra forma durante o seu ciclo evolutivo: as amastigotas, que não possuem flagelo livre e são parasitos intracelulares obrigatórios, desenvolvendo-se no interior de macrófagos dos hospedeiros vertebrados. As formas promastigotas são flageladas e, como dito acima, encontram-se no trato digestório dos hospedeiros invertebrados. Estes hospedeiros estão limitados a insetos hematófagos da família *Psychodidae* (RATH *et al.*, 2003), que estão

divididos entre dois gêneros de dípteros: o gênero *Lutzomya*, vetores de transmissão do parasito nas Américas, e o gênero *Phlebotomus*, relacionado com a transmissão no Velho Mundo. Já os hospedeiros vertebrados são representados pelo homem (SILVA-LÓPEZ, 2010) e por mamíferos silvestres como preguiça, roedores, raposas, tamanduá e outros, considerados portadores das leishmanioses, pois grande parte das lesões não são aparentes nestes animais. No Brasil, os reservatórios animais mais importantes são o cão e a raposa (RATH *et al.*, 2003).

O ciclo de vida do parasito inicia-se pelo estágio extracelular, na forma promastigota, que se multiplica e desenvolve no trato digestório do vetor; o estágio intracelular caracteriza-se por formas amastigotas que estão localizadas e se multiplicam no interior de vacúolos fagocíticos (fagolisossomos) nas células do hospedeiro definitivo (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

O ciclo evolutivo do parasito se encerra quando um inseto não infectado passa a ser vetor, logo após ingerir macrófagos parasitados do sangue de um hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo. A partir de então, um novo ciclo será iniciado. Formas amastigotas ingeridas pelo inseto serão convertidas em promastigota procíclica no interior do seu trato digestório e, posteriormente, será diferenciada em metacíclica, forma infectiva do parasito (KAYE, SCOTT, 2011). Após a diferenciação por metaciclogênese, que consiste numa série de mudanças na expressão gênica, na morfologia e na composição da lipofosfoglicana (LPG) presente na superfície do parasito (SARAIVA *et al.*, 1995), o protozoário irá se alojar na glândula salivar do vetor, pronto para infectar um novo hospedeiro vertebrado (KAYE, SCOTT, 2011).

FIGURA 5. Ciclo de vida da *Leishmania sp.*



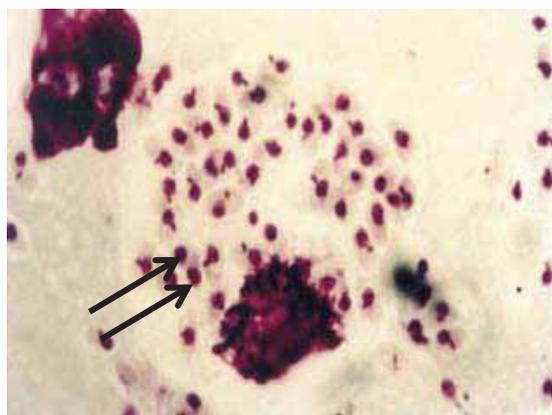
FONTE: KAYE, SCOTT, 2011.

FIGURA 6. *Leishmania* – forma flagelada ou promastigota.



FONTE: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (2010).

FIGURA 7. *Leishmania* – forma aflagelada ou amastigota presente no interior de macrófagos.



FONTE: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (2010).

As leishmanioses estão presentes no Velho e Novo Mundo, no entanto, as espécies encontradas em cada um deles são diferentes. Mais de 20 espécies de *leishmania* foram identificadas como causadoras das leishmanioses em humanos (GOTO, LINDOSO, 2010). Na Ásia, África e Europa, a leishmaniose tegumentar é causada, principalmente, pelas espécies *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania infantum*; já no Novo Mundo, principalmente, na América Latina, ela é causada pelas *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania pifanoi*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania shawi* e *Leishmania lainsoni*. A leishmaniose visceral é causada pelas *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, no Velho Mundo (GOTO, LINDOSO, 2010) e, no Novo Mundo, este tipo de leishmaniose é causado pela espécie *Leishmania infantum*, erroneamente chamada de *Leishmania chagasi*, por serem nomes diferentes para a mesma espécie do parasito (RATH *et al.*, 2003; MAURÍCIO *et al.*, 2000). O principal agente etiológico responsável pela doença, principalmente na forma cutânea, no Estado de São Paulo é a *L. braziliensis* (RATH *et al.*, 2003).

A *L. amazonensis*, espécie utilizada neste trabalho, está entre as três principais espécies identificadas no Brasil. Ela ocorre, principalmente, em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Rondônia, Pará e Tocantins), mas também pode ser verificada em estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Foi isolada em roedores silvestres dos gêneros *Proechymis* e *Oryzomys*, no entanto, ainda não se definiu o papel destes roedores no ciclo de transmissão da doença, apesar de evidências indicá-los como reservatórios desta espécie de *leishmania*. Tem com principal vetor a espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, que apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em diferentes habitats como em países fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Tocantins,

Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, em regiões de matas úmidas com densidade elevada. Esta espécie do parasito é causadora da leishmaniose tegumentar americana caracterizada pela ocorrência de úlceras cutâneas localizadas, podendo em alguns casos apresentar-se como um quadro clássico de leishmaniose cutânea difusa (BRASIL, 2010). Tal espécie também foi isolada em pacientes que apresentaram todo o espectro das leishmanioses, incluindo lesões cutâneas difusas, mucocutâneas e comprometimento de vísceras (BARRAL *et al.*, 1991).

1.3.1. Metaciclogênese

Parasitos do gênero *Leishmania*, assim como outros tripanossomatídeos, sofrem durante o seu ciclo evolutivo, no interior do hospedeiro invertebrado, um processo de diferenciação metabólica, chamado metaciclogênese, que está entre os mais importantes do ciclo de vida destes protozoários. Nele, formas não infectivas, chamadas de promastigotas procíclicas, se transformam em formas infectivas, conhecidas como promastigotas metacíclicas. Tal alteração metabólica promove a adaptação do parasito, garantindo sua sobrevivência no interior do hospedeiro vertebrado (OUAKAD *et al.*, 2011).

Entre os diversos eventos que ocorrem durante o processo de metaciclogênese, um dos mais importantes é a regulação da expressão gênica, que sustenta a hipótese de pré-adaptação do parasito (OUAKAD *et al.*, 2011). Determinadas moléculas passam a ser expressas na superfície do parasito e possibilitam sua sobrevivência no interior do hospedeiro vertebrado. Entre estas moléculas é fundamental que estejam presentes moléculas que ativem o sistema complemento. Formas promastigotas metacíclicas ativam este sistema eficientemente, favorecendo a entrada do parasito nas células hospedeiras (SACKS, 1989).

1.4. Modo de transmissão

A transmissão do parasito ocorre quando a fêmea do vetor, infectada com formas promastigotas do parasito, pica o hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo, e inocula parasitos no local da picada. As formas promastigotas metacíclicas inoculadas invadem macrófagos teciduais, no interior dos quais irão se diferenciar em formas amastigotas. Estas formas se multiplicam extensamente por divisão binária. Após o período de multiplicação, as células parasitadas se rompem, liberando parasitos na corrente sanguínea, o que pode acarretar a infecção de macrófagos ainda não parasitados, células dendríticas e fibroblastos (SILVA-LÓPEZ, 2010; SERENO *et al.*, 2007).

1.5. Aspectos clínicos

A interação parasito-hospedeiro pode resultar em um amplo espectro de doenças, coletivamente chamadas leishmanioses, que se manifestam de diversas maneiras, desde lesões cutâneas até a forma visceral, letal quando não tratada (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

As principais formas de apresentação destas doenças são as seguintes (CARVALHO, FERREIRA, 2001; GOTO, LINDOSO, 2010):

- Visceral: também conhecida como Calazar, se caracteriza por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia;
- Cutânea: no Velho Mundo, o aspecto clínico apresentado por esta forma da doença não é uniforme e pode variar de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro (como em casos de co-infecção HIV-*leishmania*); nas Américas apresenta amplo espectro de manifestações (lesões únicas ou limitadas, forma cutânea difusa e mucocutânea);

- Cutânea difusa: caracteriza-se pela presença de lesões nodulares não ulcerativas, ricas em parasitos; é uma condição rara das leishmanioses e tem sido reportada nas Américas do Sul e Central e também na Etiópia;
- Mucocutânea: apresenta-se por meio de lesões que levam à destruição total ou parcial da mucosa oral, nasal e/ou faríngea, gerando deformações que podem segregar suas vítimas socialmente. Esta forma de manifestação da doença não costuma ser fatal, no entanto, suas complicações, associadas a infecções oportunistas e dificuldades para a alimentação, podem resultar em morte.

As formas visceral, cutânea difusa e mucocutânea são as formas mais severas da doença e se relacionam à resposta imune do hospedeiro; já a forma cutânea ocorre, normalmente, em indivíduos imunocompetentes e apresenta cura espontânea (Sundar e Rai, 2002). Costuma-se classificar as manifestações cutânea, cutânea difusa e mucocutânea como leishmaniose tegumentar. Uma característica marcante das leishmanioses cutâneas é presença de lesões ulcerativas em áreas expostas (CUNHA *et al.*, 2011). Estas lesões são indolores, podem ser únicas ou múltiplas e ter a região central hemorrágica, em alguns casos (GOTO, LINDOSO, 2010).

Existem ainda outras duas formas destas doenças, no entanto, são mais raras. A leishmaniose dérmica após Calazar (leishmaniose dérmica pós kala-azar) ocorre na Índia e, principalmente, no Sudão e no Quênia, resultante da complicação de casos de leishmaniose visceral. Já a leishmaniose viscerotrópica, observada em soldados que serviram no Iraque, é um tipo diferenciado de leishmaniose visceral causada pela *L. tropica* e está associada a episódios de febre inespecífica com fadiga, artralgia e diarreia (CARVALHO, FERREIRA, 2001).

Nos últimos anos, as leishmanioses caninas tem chamado atenção, pois entre os potenciais reservatórios animais, os cães domésticos têm se destacado como hospedeiros destes parasitos. Pelo fato da domesticação e proximidade com humanos, estes animais têm facilitado a transmissão destas doenças entre humanos. As manifestações clínicas apresentadas pelos cães podem ser facilmente confundidas com outras doenças, podendo também não existir sinais óbvios do parasitismo (CARVALHO, FERREIRA, 2001). Para evitar tais confusões, devem-se avaliar os sinais clínicos apresentados por estes animais, quando estes existirem, como linfadenopatia, úlceras na pele e hipertermia (sinais mais observados em cães infectados), assim como, os achados epidemiológicos. Para a confirmação do diagnóstico, devem ser realizados exames sorológicos (MATTOS JÚNIOR *et al.*, 2004).

1.6. Terapia medicamentosa das leishmanioses

As leishmanioses são doenças relacionadas à pobreza. Em geral, afetam populações muito pobres e se associam à desnutrição, analfabetismo, condições precárias de habitação, deslocamento, fraqueza do sistema imunológico, discriminação de gênero, falta de recursos financeiros e mudanças ambientais (WHO, 2012). Como outras doenças infecciosas, estas doenças são consideradas doenças negligenciadas, para as quais faltam tratamentos eficazes, acessíveis e de fácil uso (YAMEY, TORRELE, 2002). A indústria farmacêutica, tradicionalmente, ignora tais doenças, já que afetam principalmente populações de países em desenvolvimento e correspondem a apenas 20% do total global da venda de medicamentos, apesar desta porcentagem representar o consumo de medicamentos de 80% da população mundial (FUNARI, FERRO, 2005). As políticas públicas criadas pelos governos deixam por conta destas indústrias o desenvolvimento de novos fármacos que, por sua vez, não o fazem por visarem o desenvolvimento de fármacos lucrativos e de fácil comercialização, como os

designados aos tratamentos de dor, câncer, doenças cardíacas e calvície (YAMEY, TORRELE, 2002). Entre os anos de 1975 e 2004, dos 1556 novos medicamentos aprovados, apenas 21 eram destinados ao tratamento específico de doenças tropicais e tuberculose, sendo que juntas, estas doenças representam 11,4% do total de doenças mundiais (DNDi, 2010). Durante este período, de 1975 a 1999, foram desenvolvidos 15 novos produtos destinados ao tratamento de doenças negligenciadas, contrapondo-se às 179 novas drogas para o atendimento de portadores de doenças cardiovasculares (FUNARI, FERRO, 2005).

Desde 1912 são conhecidos compostos com atividade leishmanicida e o primeiro a ser utilizado foi o tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio). No entanto, devido aos seus efeitos tóxicos e severos efeitos colaterais, como intolerância gastrintestinal e efeitos cardiotoxicos, este antimônio trivalente foi substituído por compostos estibiados pentavalentes, que proporcionaram redução dos efeitos adversos e da toxicidade. Em 1920, desenvolveu-se o primeiro composto com base em um antimônio pentavalente, a uréia estibamina (Estibamine[®]) e, em 1936, introduziu-se o gluconato de antimônio (V) sódico na terapia médica. Em geral, os antimoniais pentavalentes se mostraram 10 vezes menos tóxicos que os antimoniais trivalentes (RATH *et al.*, 2003), apesar de ainda causarem alguns efeitos adversos como dor no local da injeção, disfunção gastrintestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias e pancreatite (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

Atualmente, os antimoniais pentavalentes são amplamente empregados na terapêutica de todas as formas de leishmanioses. Os mais, frequentemente, utilizados são o gluconato de antimônio (V) sódico ou estibogluconato de sódio (Solustibosan[®] ou Pentostam[®]) e o antimoniato de N-metil glucamina ou antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]) (SINGH, SIVAKUMAR, 2004). Estes fármacos, provavelmente, atuam inibindo a glicólise e a beta-oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas do parasito, provocando a depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH *et al.*, 2003). É possível, ainda, que proteínas de zinco

estejam envolvidas como possível alvo da ação destes compostos (DEMICHELI *et al.*, 2008). No Brasil, o medicamento de primeira escolha na terapêutica é o antimoniato de N-metilglucamina (RATH *et al.*, 2003).

Durante muito tempo, os antimoniais pentavalentes foram utilizados com grande sucesso, no entanto, a partir da década de 70, os casos de resistência, especialmente para leishmaniose visceral, começaram a aparecer, mesmo com aumento de dose (SINGH, SIVAKUMAR, 2004), como mostrado por Thakur *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 1998; Mandal *et al.*, 2009; Maltezou, 2010; e, Sinha *et al.*, 2011. Concomitantemente, no final desta década e início dos anos 80, o tratamento com pentamidina, fármaco utilizado como segunda linha de tratamento, mostrou-se eficaz apresentando 98,8% de taxa de cura; no entanto, ainda na década de 80, o índice de cura declinou (SINGH, SIVAKUMAR, 2004).

A pentamidina, comercializada como Lomidina[®], atua interferindo na síntese de poliaminas por meio da inibição do uso da S-adenosil-L-metionina, por inibir enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo, desta maneira, a síntese de moléculas importantes à vida do parasito, que atuam na regulação do crescimento e diferenciação celular. Além disto, tal substância é capaz de se ligar ao DNA do parasito em regiões ricas em sequências A-T (adenina-timina), interferindo na biossíntese desta molécula e prejudicando, assim, a manutenção da vida deste parasito (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). Este fármaco apresenta-se relativamente eficaz na terapia das leishmanioses, no entanto, sua toxicidade caracteriza um fator limitante ao seu uso (RATH *et al.*, 2003). A incidência e a gravidade destes efeitos adversos são maiores com o aumento de dose e do período de tratamento. No caso da leishmaniose cutânea, o tratamento utilizando pentamidina em baixas doses e por curto período de tempo apresenta boa taxa de cura e menor toxicidade quando comparado ao tratamento com antimoniais pentavalentes, apesar de efeitos adversos como mialgias, dor no local da administração, náuseas, dores de cabeça e hipotensão terem

sido observados. Sendo assim, este fármaco representa uma alternativa ao tratamento com antimoniais e é tido como tratamento de escolha em novos casos desta forma das leishmanioses ou em casos de resistência aos antimoniais (SINGH, SIVAKUMAR, 2004; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). No tratamento da leishmaniose visceral, por sua vez, a pentamidina apresenta efeitos tóxicos maiores do que os apresentados pelos antimoniais, ocorrendo exacerbação dos efeitos citados acima e incidência de taquicardia e hiperglicemia, devido à necessidade de administração de altas doses do fármaco (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

A anfotericina B, outro fármaco de segunda escolha, tem sido utilizada em casos de resistência aos antimoniais pentavalentes e à pentamidina. No entanto, apresenta elevada toxicidade devido ao seu mecanismo de ação, que atua em moléculas de esterol, principalmente ergosterol, presentes na membrana celular do parasito, alterando a permeabilidade da membrana e equilíbrio osmótico da célula. Sua semelhança com moléculas de colesterol, presentes na membrana de células humanas, explica a ocorrência de efeitos tóxicos durante o tratamento, como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio. A associação de formulações lipídicas com anfotericina B reduziu a toxicidade deste fármaco, pois estas formulações são pouco absorvidas pelos rins, órgão alvo de toxicidade deste fármaco, apesar de serem bem absorvidas por células do sistema fagocítico mononuclear, nas quais residem os parasitos. Tal modificação caracterizou um novo avanço na terapêutica das leishmanioses (SINGH, SIVAKUMAR, 2004; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). No entanto, a necessidade de hospitalização por longos períodos e monitorização contínua, além dos elevados custos do fármaco e da elevada incidência de efeitos adversos (em alguns casos bastante graves), são importantes entraves na utilização destas novas formulações (SUNDAR, RAI, 2002), indicadas, principalmente, em casos graves e resistentes de leishmaniose visceral, visto que

para o tratamento de leishmanioses tegumentar, outros fármacos ainda se mostram eficazes (SINGH, SIVAKUMAR, 2004).

Assim como a pentamidina, que apresenta elevada toxicidade quando administrada em altas doses; a anfotericina B e suas formulações, que além da toxicidade apresentam altos custos; os antimoniais pentavalentes também apresentam seus efeitos adversos, no entanto, continuam a ser o método mais barato para o tratamento das leishmanioses em países em desenvolvimento e, por isso, o mais utilizado (SINGH, SIVAKUMAR, 2004). Associado aos efeitos adversos e à toxicidade, a hospitalização é necessária em muitos casos, já que a maioria dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento das leishmanioses são injetáveis (RATH *et al.*, 2003), com exceção da miltefosina, primeiro fármaco leishmanicida de administração oral (SUNDAR, RAI, 2002), desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer e que atua, provavelmente, induzindo a célula do parasito à apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídios, assim como atua em células tumorais, ou inibindo a síntese de lipofosfoglicana (LPG) e glicoproteína 63 (gp63), já que o seu mecanismo de ação frente à *Leishmania* é ainda bastante controverso (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). Justifica-se, portanto, o desenvolvimento de novos fármacos com base no ciclo de vida do parasito. Na busca de fármacos mais eficazes, menos tóxicos e de fácil administração, a fitoterapia tem se mostrado uma excelente alternativa.

1.7. Uso de produtos naturais

O uso de plantas, inicialmente, para consumo alimentício e, mais tarde, para a cura de enfermidades, data de alguns séculos antes de Cristo. A medicina tradicional é definida pela OMS como o conjunto de conhecimentos teóricos e práticos, explicáveis ou não, aplicados para diagnóstico, prevenção e tratamento, com base em experiências e observações, e transmitida de forma verbal ou escrita de geração para geração. Os conhecimentos e as

práticas de saúde deixadas por outras gerações permanecem até os dias de hoje e vêm auxiliando o desenvolvimento da medicina moderna (PEREIRA *et al.*, 2004).

Ainda segundo a OMS, 80% da população mundial faz uso da medicina popular para suprir suas necessidades de assistência médica privada, o que pode levar a um giro de aproximadamente 22 bilhões de dólares. A partir disto, pode-se afirmar que plantas medicinais ainda ocupam lugar de destaque entre as possibilidades terapêuticas. Para muitas comunidades e grupos étnicos, este é o único recurso terapêutico disponível. Sabe-se que o uso de plantas ocorre das formas mais variadas como chás, xaropes, infusões; mas, além disto, pode-se dizer que o conhecimento sobre os princípios ativos contidos nas mesmas é limitado. Produtos naturais de uso tradicional devem ser tratados com o mesmo rigor de medicamentos, baseando-se em evidências consistentes e reconhecendo a eficácia, quando necessário, assim como os efeitos adversos e as possíveis interações medicamentosas (MACEDO *et al.*, 2007).

A medicina popular fornece base para a pesquisa de bioativos com potencial para o tratamento de muitas doenças, como leishmanioses, Doença de Chagas, tuberculose, entre outras enfermidades, que se utilizam de produtos naturais como uma alternativa terapêutica. A busca de moléculas naturais além de servir como fonte para a síntese de novas substâncias contra estas doenças, proporcionando grande avanço no tratamento empregado atualmente (antimoniais pentavalentes são utilizados há 50 anos para o tratamento das leishmanioses) (CARVALHO, FERREIRA, 2001), encurta o caminho do desenvolvimento de novos fármacos, visto que indicações da atividade biológica já estariam disponíveis, por meio do conhecimento popular, antes mesmo de se iniciarem os estudos científicos (FUNARI, FERRO, 2005). Substâncias com potencial leishmanicida podem ser extraídas de uma grande variedade de famílias e espécies de plantas, principalmente, entre as presentes em Florestas da América do Sul e África, onde foram encontrados dezenas de novos compostos com potencial leishmanicida, nos últimos anos (CARVALHO, FERREIRA, 2001).

Atualmente, têm-se observado a expansão mundial do mercado de produtos derivados de plantas (cosméticos, corantes, repelentes de insetos, suplementos alimentares, fitoterápicos, etc.). Em países industrializados, 25% dos fármacos empregados são provenientes, direta ou indiretamente, de produtos naturais; fato este que possibilita a entrada de países com grande biodiversidade vegetal no mercado farmacêutico ou de suplementos alimentares, caracterizando boa oportunidade de desenvolvimento. Nos Estados Unidos, por exemplo, entre 1990 e 1997, o mercado de remédios à base de ervas cresceu 380%; e, na Alemanha, 70% da população declarou recorrer à “medicina natural” como primeira linha de tratamento para doenças de menor gravidade ou pequenas disfunções. Com base nisto, pode-se concluir que o Brasil, por estar classificado entre um pequeno número de países ditos megadiversos (conta com aproximadamente 200.000 espécies registradas e cerca de 20% da flora mundial), apresenta grande potencial fitoterápico, podendo investir na descoberta de novas alternativas para o tratamento de doenças típicas de países em desenvolvimento, além de estimular o crescimento de sua economia. Ainda pelo fato de se distinguir entre estes países, devido ao seu nível de desenvolvimento em pesquisa científica, com universidades e institutos de pesquisa bem equipados, assim como pesquisadores bem preparados e comunidades tradicionais detentoras de um vasto conhecimento de espécies vegetais e animais, pode-se dizer que o país tem capacidade de se destacar em biotecnologia no cenário mundial (FUNARI, FERRO, 2005).

Provavelmente, o Brasil é o país com maior biodiversidade em plantas terrestres no mundo, possivelmente com exceção apenas para a Bolívia (SHEPHERD, 2003). Ele abriga de 10 a 20% do número de espécies conhecidas atualmente pela ciência, e em torno de 30% das florestas tropicais no mundo. No entanto, o conhecimento científico apresentado atualmente sobre a biodiversidade brasileira está longe de ser satisfatório. Coleções restritas com amostragem pouco representativa dos ecossistemas, problemas de taxonomia e falta de

especialistas dificultam a catalogação da biodiversidade, entre outras razões. Para a obtenção de informações, sobre o número de espécies que compõem a flora e a fauna brasileiras, realizam-se estimativas, muitas vezes, baseadas em extrapolações de dados de regiões bem conhecidas do país (SANTOS, CÂMARA, 2002).

As plantas superiores são melhores catalogadas, mas a contagem total também está longe de ser confiável. Estima-se que o número total de espécies varie de 50.000 a 55.000. No entanto, é possível que ainda haja um acréscimo de cerca 10% de plantas ainda não estudadas, segundo estimativas (SANTOS, CÂMARA, 2002). Devido a esta imensa diversidade vegetal e o tradicional uso de muitas plantas na medicina popular, extratos de plantas medicinais foram testados em estudos realizados no Brasil, Bolívia, Argentina, México e Colômbia para verificar o potencial antibacteriano, antifúngico, moluscicida, antiprotozoário e/ou antiviral destas plantas. Como resultado, observou-se atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp*, em algumas delas (LUIZE *et al.*, 2005).

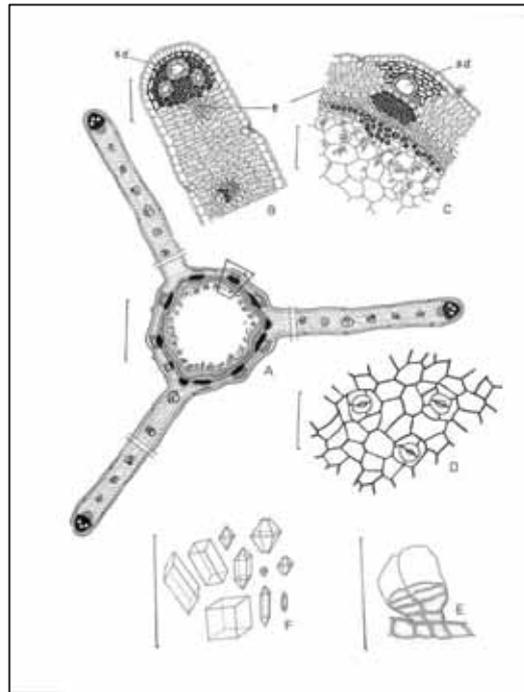
1.7.1. *Baccharis trimera* (Less.) DC

O gênero *Baccharis* é constituído por mais de 500 espécies, que podem ser encontradas dos Estados Unidos à Argentina, considerando que 90% ocorrem na América do Sul (BUDEL *et al.*, 2005), principalmente em áreas tropicais e montanhosas (VERDI *et al.*, 2005). A presença de grande variedade de espécies brasileiras e andinas caracteriza estas regiões como provável origem do táxon. No Brasil, a região sudoeste apresenta, aproximadamente, 120 espécies da planta (BUDEL *et al.*, 2005), que está entre as mais comercializadas no país e tem o estado do Paraná como principal produtor (BUDEL *et al.*, 2003).

A espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC pertence à família Asteraceae (VERDI *et al.*, 2005), à tribo Astereae e subtribo Baccharidinae (BUDEL *et al.*, 2005). Apresenta ramos

cilíndricos, triados, com até 1m de altura, áfilos ou com raras folhas sésseis e reduzidas nos nós (FARM. Bras., 2010). Como uma espécie alada é composta por três alas interrompidas, mais largas que as de outras espécies e que medem de 0,5 a 1,3cm de largura. Estas alas estão dispostas de maneira equidistante no eixo caulinar. Se analisada em vista frontal, apresenta células epidérmicas com contorno poligonal e, em secção transversal, a epiderme se mostra uniestratificada e revestida por cutícula delgada. Foi demonstrada a presença de estômatos anisocíticos e anomocíticos, ligados na mesma linha ou ligeiramente acima das células epidérmicas. Observou-se a presença de tricoma glandular pluricelular bisseriado (um tipo de tricoma tector pluricelular) composto de cinco células na base e uma célula apical afilada periclinalmente alongada e em forma de T. Em relação à tipologia dos cristais de oxalato de cálcio, foram observadas formas piramidais e prismáticas de diferentes tamanhos (BUDEL, DUARTE, 2009).

FIGURA 8. Aspectos macro e microscópicos da *Baccharis trimera* (Less) DC.



FONTE: Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, v. 2. (2010).

NOTA: A – esquema representativo do caule com três alas, em secção transversal. B – detalhe da margem da ala; endoderme (e); canal esquizógeno (sd). C – detalhe de uma porção do caule em secção transversal, indicado em A; endoderme (e); canal esquizógeno (sd). D – detalhe da epiderme da ala com cutícula estriada e estômatos anisocíticos. E – tricoma glandular. F – cristais de oxalato de cálcio em forma de prismas octaédricos e prismas retangulares.

As espécies do gênero *Baccharis* compreendidas no grupo *Trimera*, se assemelham pela presença de cladódios, ou seja, caules alados. Recebem, popularmente, o nome de carquejas. De acordo com a medicina popular, estas espécies aladas são aplicadas, principalmente, como diurético, hepatoprotetor e/ou digestivo. Pela dificuldade de identificação e grande semelhança entre elas, frequentemente, espécies distintas são confundidas e utilizadas para as mesmas finalidades terapêuticas. Na indústria, são utilizadas na produção de fitoterápicos, principalmente, em formulações emagrecedoras (BUDEL, DUARTE, 2009).

FIGURA 9. *Baccharis trimera* (Less) DC.



FONTE: Manual de Identificação de Plantas Infestantes – ARROZ (2010).

Baccharis trimera (Less.) DC tem por nome popular carqueja amarga – pelo fato de suas partes aéreas apresentarem sabor amargo - e por sinonímia científica *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker, segundo FARMACOPEIA Brasileira, 2010. Entre todas as carquejas, esta é a espécie mais estudada farmacologicamente. Tal planta possui propriedades anti-inflamatória, analgésica, bacteriostática, bactericida e antidiabética, entre outras (BUDEL, DUARTE, 2009).

A análise fitoquímica do gênero *Baccharis* destaca a presença, principalmente, de flavonoides, com nítido acúmulo de flavonas, e de di- e triterpenos. Entre os terpenóides, os diterpenos formam o grupo de maior ocorrência e são representados, em especial, pelos neo e ent-clerodanos e, em menor quantidade, pelos labdanos e kauranos. No entanto, apesar do conhecimento e isolamento de grande número de compostos, pouco se conhece sobre a atividade biológica destas substâncias. Testes realizados a partir de extratos brutos e frações de plantas do gênero mostraram que boa parte das atividades apresentadas estão relacionadas a terpenos e tricotecenos e não a flavonoides (VERDI *et al.*, 2005).

Em relação à espécie *B. trimera*, estudos fitoquímicos utilizando partes aéreas da planta resultaram, por meio de processos de isolamento e identificação, no conhecimento de

diversos metabólitos secundários. Entre eles estão presentes diterpenos, sendo muitos deles do tipo clerodânico, e flavonoides, principalmente, flavonas. Avaliando-se a atividade biológica dos diterpenos clerodânicos isolados, revelou-se, entre outras atividades, ação relaxante sobre a musculatura lisa vascular (BORELLA *et al.*, 2006; GIANELLO *et al.*, 2000; HERZ *et al.*, 1977; NAKASUGI, KOMAI, 1998; JANUÁRIO *et al.*, 2004; TORRES *et al.*, 2000). Tal efeito pode estar relacionado à vasodilatação e melhora da circulação sanguínea relatada segundo o seu uso popular. Em relação aos flavonoides, esta mesma espécie apresentou importante atividade analgésica e anti-inflamatória, atribuída em especial às saponinas. O isolamento de flavonoides, a partir do extrato metanólico e acetato de etila, resultou em compostos com propriedades antimutagênicas e anti-hepatotóxicas, respectivamente. A partir destas atividades, fundamenta-se o uso tradicional da planta para o tratamento de doenças do fígado e reumatismo (VERDI *et al.*, 2005).

1.8. Ensaios *in vitro* para avaliação de atividade leishmanicida

A fitoterapia é empregada no tratamento de muitas doenças desde os primórdios da humanidade. Apesar dos avanços conquistados no campo da síntese química, muitas drogas utilizadas hoje em dia, ainda tem sua origem, direta ou indiretamente, relacionada ao reino vegetal (CARVALHO, FERREIRA, 2001). Nos últimos anos, têm-se observado a renovação do interesse mundial por produtos naturais derivados da biodiversidade. Tal interesse vem incentivando países industrializados a investir em bioprospecção (FUNARI, FERRO, 2005), na busca de novos e potenciais agentes contra doenças amplamente difundidas como as leishmanioses. No entanto, para alcançar este propósito são necessários investimentos no aprimoramento e descoberta de novos métodos extrativos e de identificação de compostos extraídos de plantas (CARVALHO, FERREIRA, 2001), assim como, no desenvolvimento de métodos rápidos, fáceis de manipular e quantificar, que sejam reprodutíveis e que mimetizem

as condições encontradas pelo parasito na célula hospedeira, para avaliar a atividade leishmanicida destes compostos (SERENO *et al.*, 2007). Atualmente, estão disponíveis ensaios biológicos envolvendo a manipulação tanto de formas promastigostas quanto de amastigostas de *leishmania*. Os principais ensaios são: contagem direta de promastigotas (CHAN-BACAB *et al.*, 2003), amastigotas axênicas (CALLAHAN *et al.*, 1997), amastigotas intracelulares (DUBE *et al.*, 2005), colorimétrico de MTT de promastigotas (BERG *et al.*, 1994), colorimétrico de MTT de amastigotas axênicas (SERENO, LEMESRE, 1997) e leishmanias transgênicas expressando GFP - Green Fluorescent Protein (BOLHASSANI *et al.*, 2011).

Triagens iniciais de novos compostos naturais ou sintéticos podem ser realizadas em etapas utilizando-se, primeiramente, formas promastigotas e, em seguida, com as substâncias que demonstrarem algum potencial leishmanicida, formas amastigotas intracelulares. Mesmo sendo a forma amastigota intracelular a forma clinicamente relevante do parasito, realizam-se ensaios iniciais com as formas extracelulares, pelo fato destas serem mais fáceis de manipular e tornarem o ensaio mais barato. No entanto, apesar de ambas as formas compartilharem muitas vias metabólicas, compostos ativos sobre uma delas, podem não ser para a outra, como ocorre no caso dos antimoniais pentavalentes. Estes compostos são ativos somente sobre formas amastigotas (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2010), pois são pró-fármacos metabolizados no interior das células do hospedeiro (macrófagos) ou próximos a elas, onde ocorre a conversão da forma pentavalente, pouco tóxica, na forma trivalente, mais tóxica e ativa sobre formas amastigotas do parasito (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). Portanto, pode-se concluir que compostos promissores podem ser perdidos a partir desta abordagem. Todavia, substâncias que se mostrarem ativas na primeira triagem, podem falhar quando testadas em formas intracelulares. Para ser ativo frente a estas formas, o composto deve ser capaz de atravessar a barreira representada por uma dupla camada de membranas (a membrana plasmática da célula

hospedeira e a membrana fagolisossomal), assim como manter-se estável em baixo pH e na presença de radicais livres, no interior do vacúolo parasitóforo. Portanto, como ensaios biológicos utilizando formas promastigotas são mais fáceis de realizar e mais baratos, a escolha de tal estratégia facilita a busca de novos candidatos à terapêutica das leishmanioses, mas não exclui a necessidade de testes sequenciais (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2010).

2. Desenvolvimento

2.1. Justificativa

Em muitos países, a terapia atualmente empregada para o tratamento das leishmanioses ainda se baseia em antimoniais pentavalentes. Estes fármacos, além de apresentarem elevada toxicidade, estão associados a muitos casos de resistência. Na Índia, com o aparecimento de cepas resistentes aos antimoniais, os fármacos de escolha passaram a ser o miltefosina (formulação oral) e a anfotericina B (formulação lipossomal), os quais promoveram significativa melhora na terapêutica. No Brasil, os antimoniais ainda se mostram efetivos contra muitas infecções, mas limitados estudos sobre resistência estão disponíveis (REIMÃO *et al.*, 2012). No entanto, assim como o desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados, outros fatores estão relacionados à problemática do tratamento medicamentoso empregado atualmente: são frequentes os casos de reincidência da doença – em alguns casos, a carga parasitária atinge níveis difíceis de detectar e determinado tempo depois reaparece, podendo fazer com que o tratamento utilizado previamente deixe de ser efetivo; os elevados custos e o longo período de tratamento dificultam a adesão à terapêutica, auxiliando a manutenção da alta prevalência desta doença (CARVALHO, FERREIRA, 2001).

Tendo em vista o quadro atual, vê-se a necessidade do desenvolvimento de fármacos mais seguros, eficazes e com menor custo, a partir de triagens de compostos originários de plantas. A espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC, além de apresentar atividade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antimutagênica, anti-hepatotóxica, entre outras, apresentou atividade moderada frente a formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, quando testado seu extrato (LUIZE *et al.*, 2005). O gênero *Baccharis* apresenta-se amplamente distribuído nas Américas, principalmente na América do Sul, e só no Brasil são descritas aproximadamente 120 espécies, sendo a espécie em estudo uma espécie brasileira (VERDI *et al.*, 2005).

Portanto, baseado em evidências presentes na literatura, a espécie em estudo pode revelar compostos ou substâncias isoladas com promissora atividade medicamentosa frente às leishmanioses. O presente estudo visou auxiliar a busca por novos fármacos, mais eficazes e seguros, para o tratamento destas doenças que acometem 12 milhões de pessoas em todo o mundo (CUNHA *et al.*, 2011).

2.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial leishmanicida do extrato acetato de etila de partes aéreas da *Baccharis trimera* (Less.) DC e de suas frações e subfrações sobre a espécie *L. amazonensis*. Com o intuito de avaliar a toxicidade dos compostos ativos frente a macrófagos (células intimamente ligadas ao ciclo do parasito no hospedeiro vertebrado), foram realizados ensaios colorimétricos de MTT, utilizando-se a linhagem J774.

O trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

1. Seleção de frações e subfrações com atividade antiprotozoário (promastigotas) promissora;

2. Avaliação da citotoxicidade de compostos ativos sobre macrófagos da linhagem J774.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Material

2.3.1.1. Meios, soluções e reagentes

- Acetato de etila – Qhemis[®]
- Ácido clorídrico - Synth[®]
- Água destilada
- Água estéril
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio - Usb[®]
- Corante azul de tripan - Merck[®]
- Dimetilsulfóxido - Synth[®]
- Dodecil sulfato de sódio - Sigma[®]
- Fenazina metassulfato - Sigma[®]
- Hexano - Qhemis[®]
- Isopropanol - Qhemis[®]
- Meio LIT – Difco Laboratories[®]
- Meio RPMI 1640 - Cultilab[®]
- Metanol - Qhemis[®]

2.3.1.2. Equipamentos e utensílios

- Agitador de tubos – Modelo AT 56A - Phoenix[®]
- Agitador Magnético – Logen Scientific[®]
- Autoclave vertical - Phoenix[®]
- Balança semi-analítica – AG 200 Gehaka[®]
- Bomba a vácuo – Modelo MA058 - Marconi[®]
- Câmara de fluxo laminar - Veco[®]

- Câmara de Neubauer – BOECO[®] Germany
- *Cell scraper* (“rodinho”) – 23 cm estéril - TPP[®]
- Centrífuga Excelsa Baby II – Modelo 206 R - Fanem[®]
- Espectrofotômetro – Readwell plate - Robonik[®]
- Estufa incubadora – New Brunswick Scientific CO27
- Estufa incubadora do tipo BOD – Modelo 347 F - Fanem[®]
- Garrafa para cultura de células 25 cm² estéril - TPP[®]
- Microplacas com 96 orifícios de fundo chato com tampa estéril - TPP[®]
- Microscópio - Olympus[®] CK2
- Pipetadores automáticos de volumes variados
- Tubo para centrífuga estéril – 15 mL - Corning[®]
- Ultrassom – Ultracleaner 1650A com aquecimento - Unique[®]
- Vidrarias em geral

2.3.1.3. Material Vegetal

Partes aéreas da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC foram coletadas na cidade de Araraquara, estado de São Paulo, no horto de plantas medicinais e tóxicas “Profª. Dra. Célia Cebrian de Araujo Reis” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP- Araraquara. O espécime de *Baccharis trimera* cultivado no Horto pertence a uma variedade desenvolvida e fornecida pela UNICAMP, tendo sido identificada pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento do Laboratório de Farmacobotânica da FCF/CAR-UNESP. A exsicata de tal espécie está depositada no Herbário CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP) sob o número 1286. Partes aéreas foram secas durante sete dias em estufa com circulação de ar à 40°C, pulverizadas em moinho de facas e armazenadas em local fresco sem umidade. A partir deste material, foram preparados o extrato, as frações e subfrações.

Os dados da coleta são: 07/01/2011, 07:30 h; latitude: S 21.81453°; longitude: O 48.20170°; altitude: 662 m.

2.3.1.4. Cepa padrão

Neste estudo foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis*, pertencentes à cepa MPRO/BR/1972/M1841 – LV – 79, mantidas no Laboratório de Parasitologia da FCFAr - UNESP. Os parasitos foram cultivados em meio LIT, até a fase logarítmica tardia de crescimento, para os bioensaios de atividade leishmanicida.

2.3.2. Metodologia

2.3.2.1. Obtenção do extrato e de suas frações e subfrações

Extrato, frações, e subfrações foram cedidos pelo grupo de pesquisa do professor André Gonzaga dos Santos, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF/CAr). Tais compostos foram obtidos por processos de extração, fracionamento e análises cromatográficas, que foram realizados pela mestrandia Josiane Clarice Claudino. As amostras utilizadas neste trabalho estão presentes na Tabela 1.

TABELA 1. EXTRATO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES TRIADOS SOBRE *Leishmania amazonensis*.

Sigla	Eluente	Massa (mg)
Extrato	AcOEt	3,6
Fr. 1	Hex/AcOEt 95:05	2,6
Fr. 2	Hex/AcOEt 95:05	4,4
Fr. 3	AcOEt	6,3
Fr. 4	AcOEt	4,1
Fr. 5	AcOEt/MeOH 1:1	8,3
Fr. 6	AcOEt/MeOH 1:1	5,1
Fr. 7	MeOH	19,1
Fr. 8	MeOH	12,5
SubFr. 1	Hex/AcOEt 98:02	2,4
SubFr. 15	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	5,0
SubFr. 17	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	3,5
SubFr. 18	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	3,2
SubFr. 19	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	4,3
SubFr. 20	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	3,0
SubFr. 23	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	3,3
SubFr. 27	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	1,1*

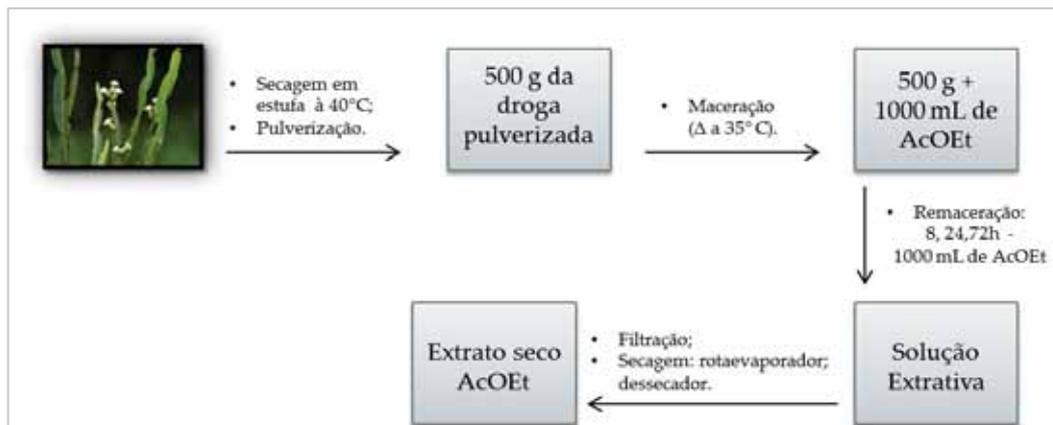
SubFr. 29	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	2,6
SubFr. 34	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	2,0
SubFr. 36	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	2,5
SubFr. 40	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	2,2
SubFr. 44	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	4,4
SubFr. 49	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	9,0
SubFr. 57	Hex/AcOEt/i-PrOH 87:12,1:0,9	10,2
SubFr. 66	Hex/AcOEt/i-PrOH 87:12,1:0,9	9,4
SubFr. 87	Hex/AcOEt/i-PrOH 83:15,8:1,2	4,7
SubFr. 100	Hex/AcOEt/i-PrOH 75:23,3:1,7	2,2
SubFr. 103	Hex/AcOEt/i-PrOH 75:23,3:1,7	8,3
SubFr. 119	Hex/AcOEt/i-PrOH 70:28:0,2	7,9
SubFr. 131	Hex/AcOEt 1:1	2,0
SubFr. 134	Hex/AcOEt 1:1	7,1
SubFr. 137	Hex/AcOEt 1:1	14,6
SubFr. 143	AcOEt	18,0
SubFr. 144	AcOEt	23,2
SubFr. 148	MeOH	25,0
SubFr. 149	MeOH	2,8
SubFr. 80:20		4,7

FONTE: Dados da pesquisa (2012).

*NOTA: A massa utilizada foi inferior ao valor estabelecido (2- 5 mg), pois não foi possível pesar maior quantidade.

O extrato de partes aéreas da *B. trimera* foi obtido por maceração com aquecimento a 35°C (temperatura padronizada para tal processo, que evita evaporação excessiva), agitação ocasional e renovação do líquido extrator (remaceração) por 72 horas. Foram utilizados 500 g de droga vegetal, intumescida com 1000 mL de acetato de etila. Iniciando o processo de extração, adicionou-se mais 1000 mL do solvente. Ao todo, realizaram-se três etapas (1000 mL cada) com duração de 8, 24 e 72 horas. O mesmo procedimento foi repetido três vezes e os extratos líquidos obtidos em cada etapa foram reunidos. A solução extrativa final foi filtrada em papel de filtro e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida (530-540 atm) à 45°C (temperatura na qual se observou o início da evaporação do solvente), obtendo-se o extrato seco (extrato AcOEt). A secagem final do extrato foi realizada em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. A seguir, foi armazenado sob refrigeração.

FIGURA 10. Fluxograma do processo de obtenção do extrato seco AcOEt.



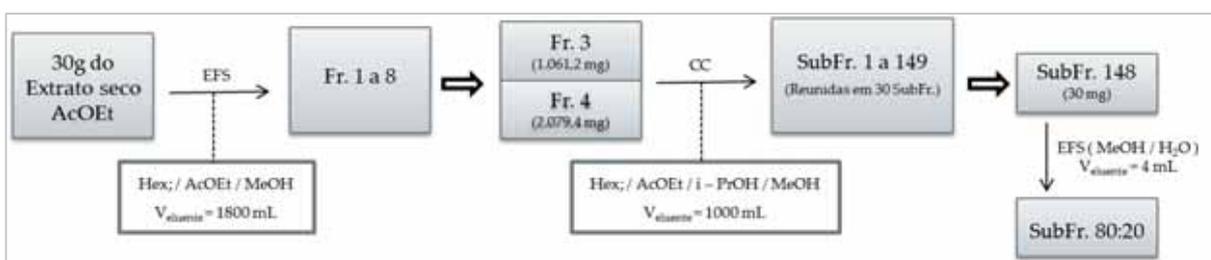
FONTE: O autor (2012).

As frações foram obtidas por extração em fase sólida (EFS). Numa coluna de vidro de 10,5 cm de diâmetro, preenchida com 12 cm de sílica gel (74 - 250 μm), foram adicionados 30g de extrato seco. Realizou-se a eluição ($V_{\text{eluyente}} = 1800 \text{ mL}$) da seguinte maneira: 1. Hex/AcOEt 95:05 (Fr. 1 e 2); 2. AcOEt (Fr. de 3 e 4); 3. AcOEt/MeOH 1:1 (Fr. 5 e 6); 4. MeOH (Fr. 7 e 8).

As Fr. 3 e 4 (porção acetato) da EFS, que apresentaram perfil cromatográfico similar foram submetidas à cromatografia em coluna (CC). Foi utilizada uma coluna de vidro de 5 cm de diâmetro interno e preenchida com 20 cm de sílica gel (40-63 μm). Adicionou-se 1.061,2 mg da fração 3 e 2.079,4 mg da fração 4. Os solventes utilizados ($V_{\text{eluyente}} = 1000 \text{ mL}$) para a eluição foram os seguintes: 1. Hex/AcOEt 98:02 (SubFr. 1 até 11); 2. Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7 (SubFr. 12 até 30); 3. 89:10,2:0,8 (SubFr. 31 até 50); 4. 87:12,1:0,9 (SubFr. 51 até 70); 5. 83:15,8:1,2 (SubFr. 71 até 90); 6. 75:23,3:1,7 (SubFr. 91 até 110); 7. 70:28:0,2 (SubFr. 111 até 130); 8. Hex/AcOEt 1:1 (SubFr. 131 até 140); 9. AcOEt (SubFr. 141 até 147); 10. MeOH (SubFr. 148). As subfrações obtidas foram reunidas em 30 subfrações, já apresentadas na Tabela 1.

A SubFr. 80:20 foi obtida por meio de EFS em sílica de fase reversa C-18 (Phenomenex® modelo Strata™ C18-E), a partir de 30 mg da SubFr. 148. Tal processo é denominado *clean-up* e teve como objetivo a eliminação de interferentes presentes na SubFr. 148, na tentativa de se obter a substância de interesse. Os solventes utilizados foram MeOH e H₂O ($V_{\text{eluyente}} = 4 \text{ mL}$) nas seguintes proporções: 1. 30:70; 2. 50:50; 3. 70:30; 4. 80:20; 5. 90:10; 6. MeOH. A fração 80:20 foi a que resultou em maior massa e, por isto, foi escolhida para a realização dos ensaios biológicos.

FIGURA 11. Fluxograma do processo de obtenção das frações e subfrações.



FONTE: O autor (2012).

Todas as frações e subfrações obtidas por EFS e CC foram secas em capela ou rotaevaporador e, a seguir, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. Por fim, foram armazenadas sob refrigeração em frascos fechados.

As análises para a obtenção do perfil cromatográfico do extrato e de suas respectivas frações e subfrações foram realizadas por CCD e CLAE-UV. Para a análise por CLAE-UV, foi realizado pré-tratamento das amostras (cerca de 5 – 10 mg), denominado *clean-up* (eliminação de impurezas) do extrato, frações e subfrações. Esta técnica incluiu uma EFS com sílica de fase reversa C-18 (Phenomenex® modelo Strata™ C18-E) usando como eluente MeOH/H₂O (95:5, v/v, 5,0ml), seguida de filtração em membrana (0,22µm, PVDF Millipore®), secagem e solubilização em metanol (1,0 mL).

2.3.2.2. Preparo do extrato e de suas frações e subfrações

2.3.2.2.1. Solução estoque do extrato, frações e subfrações

Para avaliar a atividade leishmanicida sobre formas promastigotas, foram solubilizados de 2 a 5 mg do extrato AcOEt, das frações e subfrações da *B. trimerica* em DMSO. O volume de solvente utilizado foi de 30 μL para cada 0,5 mg de amostra, resultando na concentração de 0,016667 mg/ μL ou 16.667 $\mu\text{g/mL}$.

A partir destas soluções, em microplacas de 96 orifícios, foram realizadas diluições na proporção 1:2 em DMSO para o extrato e para cada uma de suas frações.

2.3.2.2.2. Preparo da suspensão de leishmanias

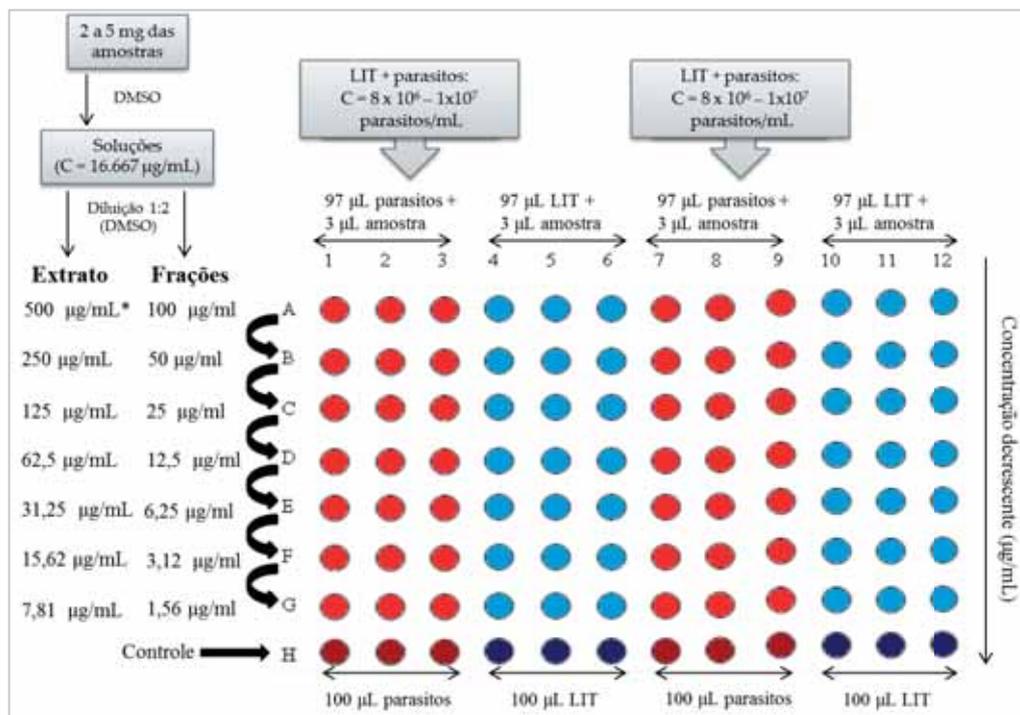
Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de SFB por sete dias, até a fase logarítmica tardia de crescimento, em estufa do tipo BOD à 28°C. No oitavo dia, preparou-se uma diluição na proporção de 1:10 em meio LIT, para a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Nos casos em que a concentração de parasitos excedeu 1×10^7 parasitos/mL, realizou-se a diluição da cultura em meio LIT, para que a concentração adequada fosse atingida. No entanto, quando a concentração de parasitos ficou abaixo de 8×10^6 parasitos/mL, armazenou-se a cultura em estufa para a adequação da concentração. Concentrações entre 8×10^6 e 1×10^7 parasitos/mL foram aceitas para a realização dos bioensaios.

2.3.2.3. Bioensaios para a determinação da atividade leishmanicida (promastigotas)

Para avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida do extrato, frações e subfrações sobre formas promastigotas, foram utilizadas microplacas de 96 orifícios, que contem oito fileiras (nomeadas de A – H) e doze colunas (numeradas de um a doze). Os bioensaios foram

realizados em triplicata. Nas colunas 1-3 e 7-9, até a fileira G, foram colocados 97µl da suspensão de parasitos e 3µl dos derivados de *B. trimera* em diferentes concentrações - para o extrato foram utilizadas concentrações de 500 a 7,81 µg/mL e para as frações e subfrações, concentrações de 100 a 1,56 µg/mL, a partir de diluições seriadas previamente preparadas - totalizando 100 µl em cada orifício. Nos orifícios da fileira H destas mesmas colunas, que foram utilizados como orifícios controle, colocou-se somente 100 µl da suspensão de parasitos. Nas colunas restantes, 4-6 e 10-12, como outro tipo de controle, foram incubadas as diferentes concentrações das amostras derivadas de *B. trimera* na ausência de parasitos. Para isto, foram adicionados 97µl de meio LIT sem parasitos e 3 µl dos derivados nas suas diferentes concentrações, resultando também em 100 µl por orifício. Na fileira H destas colunas não foram colocados amostras e adicionou-se apenas 100 µl de meio LIT sem parasitos.

FIGURA 12. Esquema ilustrativo da montagem da placa de 96 orifícios utilizada nos bioensaios.



FONTE: O autor (2012).

Após a montagem, a placa foi mantida em estufa do tipo BOD por 72 horas a 28°C. Ao final da incubação, foram adicionados 10 µl de solução MTT/PMS (1 mL de MTT a 2,5mg/ml; 4 µL de PMS a 0,22mg/ml) nos 96 orifícios da microplaca e incubou-se novamente em estufa, ao abrigo da luz, por 75 minutos a 28°C. Os cristais de formazana, formados com a redução do MTT, auxiliam na avaliação da atividade metabólica ou da viabilidade celular (Muelas-Serrano, Nogal-Ruiz *et al.*, 2000). Para dissolver estes cristais, adicionou-se 100 µl de uma solução a 10% de SDS/ HCl 0,01N e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos, também ao abrigo da luz. A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro a 492nm e os resultados foram obtidos em absorbância.

A porcentagem de parasitos mortos foi calculada em porcentagem de citotoxicidade, utilizando-se a equação abaixo (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000):

$$\%C = [(G_c - G_p) / G_c] \times 100$$

$$G_c = A_c - A_m$$

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controles (fileira H, colunas 1-3 e 7-9) e G_p o número de parasitos/mL detectados nas diferentes concentrações das amostras (fileiras A-G, colunas 1-3 e 7-9). A_c corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substâncias) com parasitos (fileira H, colunas 1-3 e 7-9); A_m representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito (fileira H, colunas 4-6 e 10-12); A_p o valor da absorbância nos testes (fileiras A-G, colunas 1-3 e 7-9) e A_{pm} , o valor da absorbância das diferentes concentrações das amostras na ausência do parasito (fileiras A-G, colunas 4-6 e 10-12). Como substância de referência foi utilizada a pentamidina. As análises foram feitas em triplicata para o cálculo do desvio padrão. Os

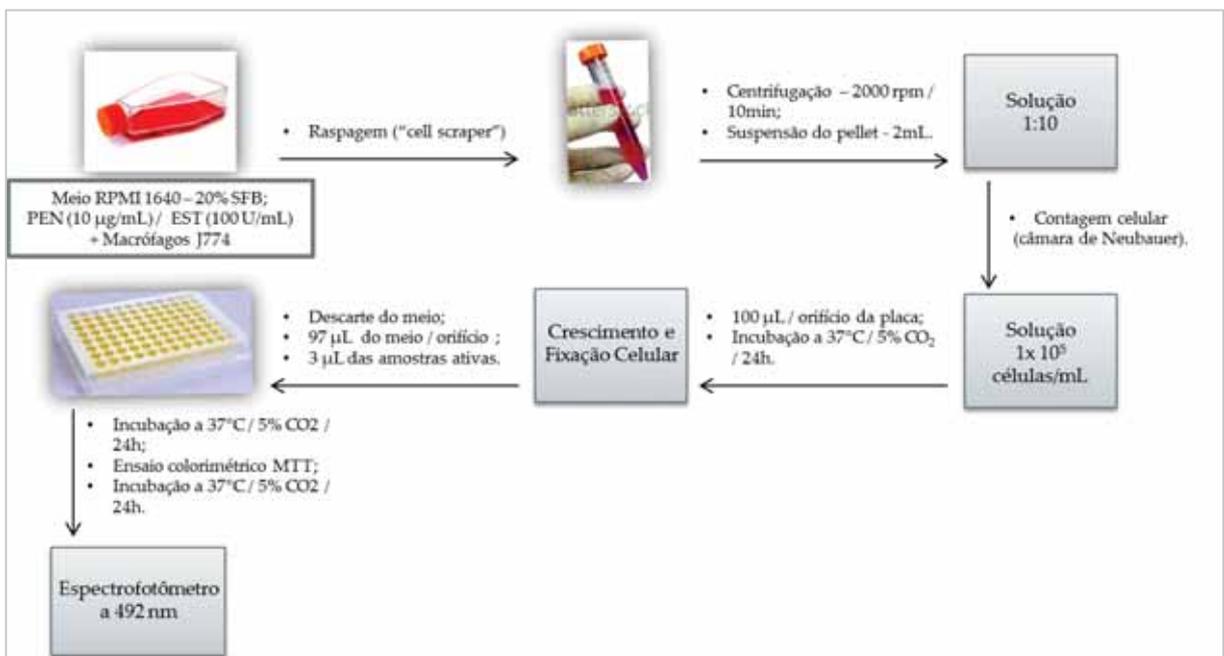
resultados, obtidos em absorbância, foram plotados em gráficos do Microsoft Excel[®] e o CI_{50} de cada amostra analisada foi determinado por regressão linear no software Origin 7.0[®].

2.3.2.4. Avaliação da citotoxicidade de compostos ativos frente a macrófagos da linhagem J774 pela técnica colorimétrica do MTT

Macrófagos da linhagem J774 utilizados na avaliação da citotoxicidade dos compostos ativos foram cedidos pelo grupo de pesquisa da Profa. Clarice Queico Fujimura Leite. As células foram cultivadas em garrafa de cultura de 25cm² contendo 10 mL do meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB e os antibióticos penicilina e estreptomicina (100 µg/mL e 100 U/mL, respectivamente). A garrafa foi mantida em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, com renovação do meio de cultura a cada dois dias. Para a realização do ensaio, raspou-se a monocamada celular, com o auxílio de *cell scraper*, e o meio contendo macrófagos foi vertido em tubo tipo falcon de 15mL estéril. A seguir, o tubo foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante formado foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2 mL do meio. Uma diluição 1:10, contendo corante vital (azul de tripan 0,02%), foi preparada para a verificação da viabilidade celular e contagem das células em câmara de Neubauer. A partir da suspensão celular, preparou-se uma solução contendo 1x10⁵ células/mL, da qual foram colocados 100 µL em cada orifício da microplaca de 96 orifícios. A placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para a fixação dos macrófagos. Após período de incubação, a placa foi observada em microscópio invertido para verificar o crescimento e fixação celular. O meio de cultura foi descartado e 97µL do mesmo meio foram adicionados nos orifícios com macrófagos fixados. Na sequência, adicionou-se 3 µL, das diferentes concentrações (100 a 1,56 µg/mL) das SubFr. 44, 148, 80:20 e pentamidina (substância controle), preparadas previamente por diluição seriada em água estéril. A placa foi incubada novamente sob as mesmas condições por 24 horas. Ao final deste período, realizou-se o

ensaio colorimétrico do MTT para avaliar a viabilidade celular. Para isto, 10 μL de MTT/PMS (1 mL de MTT a 2,5mg/ml; 4 μL de PMS a 0,22mg/ml) foram adicionados em cada orifício e a microplaca incubada por 75 minutos em estufa sob as mesmas condições, ao abrigo da luz. A seguir, adicionou-se 100 μL de uma solução a 10% de SDS/HCl 0,01N, com o objetivo de desfazer os cristais de formazana, gerados pela reação de redução do MTT (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000), por mais 30 minutos ao abrigo da luz e temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 492 nm.

FIGURA 13. Fluxograma do processo realizado para avaliação da citotoxicidade das amostras selecionadas.



FONTE: O autor (2012).

Os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados obtidos foram plotados em gráficos do Microsoft Excel[®] e o CC_{50} de cada amostra analisada foi determinado por regressão linear no software Origin 7.0[®]. O Índice de Seletividade (IS) foi calculado do pela seguinte fórmula (OSORIO *et al.*, 2007):

$$IS = CC_{50} / CI_{50}$$

O valor de CC_{50} representa a concentração citotóxica de 50%, ou seja, indica a concentração mínima dos compostos que reduziu em 50% a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774, assim como, o valor de CI_{50} representa a concentração inibitória de 50%, ou seja, a concentração mínima dos compostos que reduziu em 50% a viabilidade celular de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

3. Resultados

Ao todo, foram testados um extrato, oito frações e vinte oito subfrações, obtidas a partir da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Nos ensaios biológicos, utilizou-se como substância controle a pentamidina, fármaco amplamente empregado na terapêutica das leishmanioses atualmente. Por meio de ensaios anteriores à realização deste trabalho, padronizou-se como CI_{50} de tal fármaco a concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$. Tendo por base este valor, demonstraram interessante atividade leishmanicida três frações e cinco subfrações, sendo que duas delas apresentaram CI_{50} inferior ao da pentamidina.

Para a realização dos ensaios biológicos, os compostos foram solubilizados em DMSO e, ao final, armazenados em geladeira, onde permaneceram durante todo o período da pesquisa. Em alguns casos, foi necessária a repetição de determinados ensaios devido a resultados inconclusivos. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com as soluções estocadas.

3.1. Obtenção do extrato, frações e subfrações da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC

Para a obtenção dos compostos utilizados na realização deste trabalho, foram selecionados quatro tipos de solventes: Hex, AcOEt, i-PrOH, e MeOH – descritos por ordem

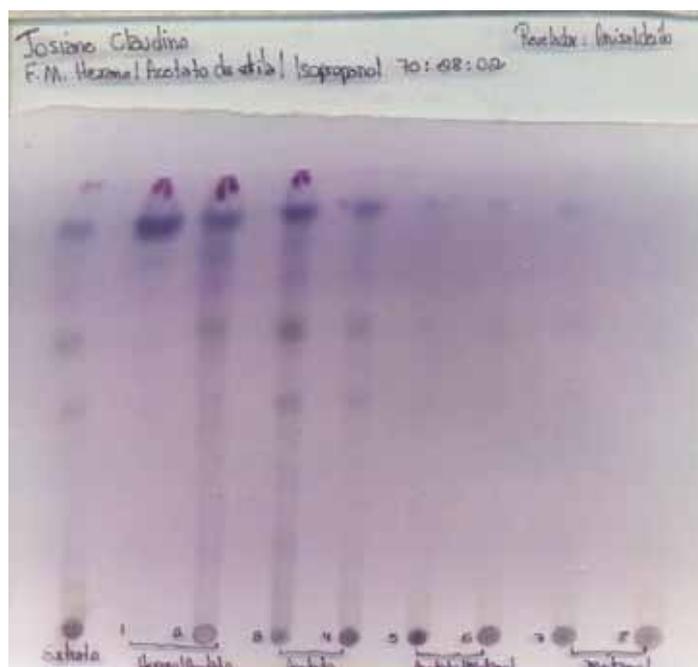
crescente de polaridade, sendo o Hex o mais apolar. O AcOEt foi o solvente escolhido para o processo de extração por ser um solvente de baixa toxicidade, fato importante, visto que para os ensaios *in vitro* foram utilizadas células vivas com o objetivo de avaliar o potencial farmacológico (ensaio com formas promastigotas da *L. amazonensis*) e a citotoxicidade (ensaio com macrófagos da linhagem J774) dos compostos em estudo frente a estas células.

Como resultado do processo de extração foram obtidos 225,72g do extrato seco AcOEt de partes aéreas de *B. trimera*. A partir do extrato seco, realizou-se EFS obtendo-se oito frações (Tabela 2). A análise por CCD destas frações permitiu comparar seus perfis cromatográficos e sugerir a presença de terpenos e flavonoides pelo o uso dos reveladores anisaldeído sulfúrico (Figura 14) e NP/PEG – UV, respectivamente.

TABELA 2. DADOS DA EFS: FRAÇÕES, ELUENTES E MASSA (g) DAS FRAÇÕES.

Frações	Eluentes	Massa (g)
1.	Hex/AcOEt 95:05	0,0537
2.	Hex/AcOEt 95:05	0,1621
3.	AcOEt	1,7867
4.	AcOEt	7,4039
5.	AcOEt/MeOH 1:1	12,1335
6.	AcOEt/MeOH 1:1	2,2439
7.	MeOH	1,6473
8.	MeOH	3,1142
Total		28,5453

FONTE: Dados da pesquisa (2012).

FIGURA 14. Cromatoplaça das frações obtidas por EFS.

FONTE: Dados da pesquisa (2012).

NOTA: Fase estacionária: Sílica Gel; Fase móvel: Hex/AcOEt/i-PrOH 70:28:2 – 150 mL; Revelador: anisaldeído sulfúrico; da esquerda para direita: extrato AcOEt, Fr. 1 a 8.

Posteriormente, para a obtenção das subfrações, realizou-se CC, utilizando-se as Fr. 3 e 4 da EFS, que apresentaram perfis cromatográficos similares. Foram obtidas 148 subfrações, reunidas em 30 e também analisadas por CCD. O rendimento em massa das subfrações está apresentado na Tabela 3 e as análises cromatográficas nas Figuras 15 e 16.

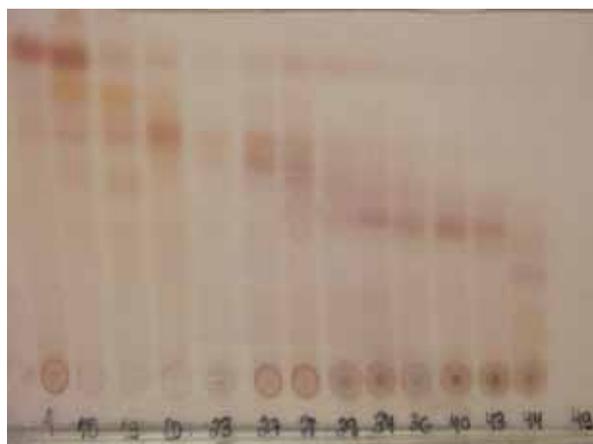
TABELA 3. DADOS DA CC: FRAÇÕES, ELUENTES E MASSA (g) DAS SUBFRAÇÕES.

Subfrações	Eluentes	Massa (g)
1.	Hex/AcOEt 98:02	0,0148
15.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0886
17.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0665
18.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0716
19.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0452
20.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0488
23.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0308
27.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0819
28.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0080
29.	Hex/AcOEt/i-PrOH 90:9,3:0,7	0,0282

34.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0139
36.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0223
40.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0178
43.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0064
44.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0058
45.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0121
47.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,0148
49.	Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8	0,1460
57.	Hex/AcOEt/i-PrOH 87:12,1:0,9	0,1876
66.	Hex/AcOEt/i-PrOH 87:12,1:0,9	0,1255
87.	Hex/AcOEt/i-PrOH 83:15,8:1,2	0,0494
100.	Hex/AcOEt/i-PrOH 75:23,3:1,7	0,0151
103.	Hex/AcOEt/i-PrOH 75:23,3:1,7	0,1010
119.	Hex/AcOEt/i-PrOH 70:28:0,2	0,1064
131.	Hex/AcOEt 1:1	0,0350
134.	Hex/AcOEt 1:1	0,0942
137.	Hex/AcOEt 1:1	0,1593
143.	AcOEt	0,1230
144.	AcOEt	0,6233
148.	MeOH	0,6000
149.	MeOH	0,0543
Total		2,3826

FONTE: Dados da pesquisa (2012).

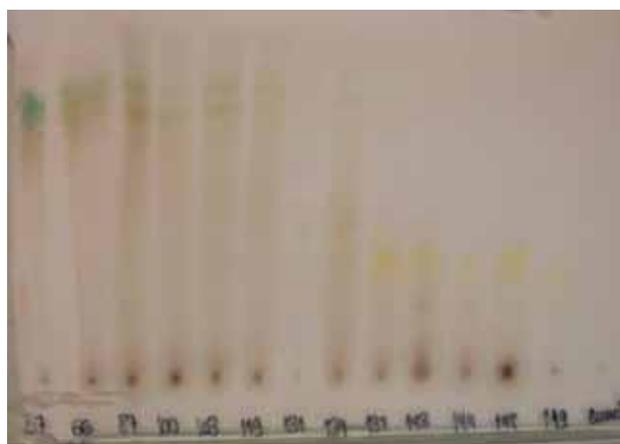
FIGURA 15. Cromatoplaça das SubFr. 1 a 49 (CC).



FONTE: Dados da pesquisa (2012).

NOTA: Fase estacionária: Sílica gel; Fase móvel: Hex/AcOEt 80:20 – 150 mL; Revelador: H₂SO₄ 10%. Frações 1 a 49.

FIGURA 16. Cromatoplaça das SubFr. 57 a 149 (CC).



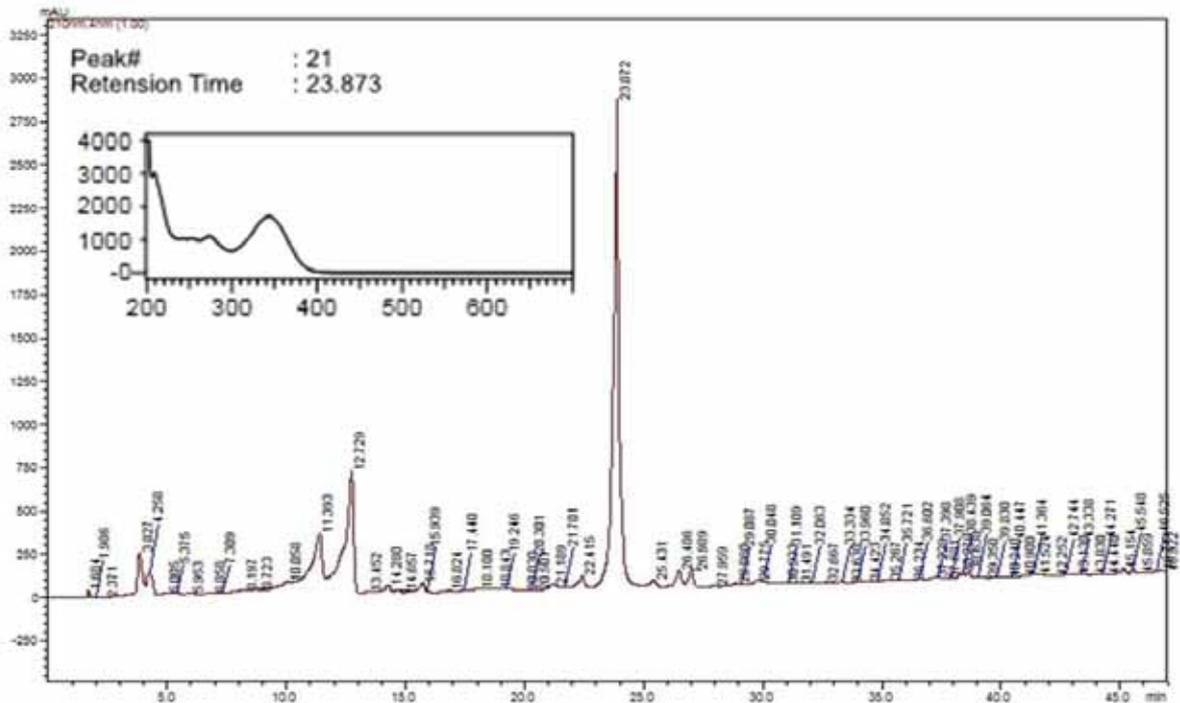
FONTE: Dados da pesquisa (2012).

NOTA: Fase estacionária: Sílica gel; Fase móvel: Hex/AcOEt/i-PrOH 60:35:5 – 150 mL; Revelador: H₂SO₄ 10%. Frações 57 a 149, quercetina (padrão).

As Figuras 15 e 16 ilustram o resultado das CCD realizadas para avaliar a separação e o perfil cromatográfico de cada uma das subfrações. Como revelador, utilizou-se H_2SO_4 por ser um revelador universal, revelando substâncias orgânicas presentes na placa. Optou-se por este tipo de revelador, por não se conhecer a natureza do possível composto com atividade leishmanicida, apesar de indícios sugerirem terpenos e/ou flavonoides. Como padrão cromatográfico, utilizou-se a quercetina para verificar a presença de tal substância, por meio de câmara de visualização no UV, nas subfrações mais polares, entre elas a 148 e 149 (eluidas com solvente polar – MeOH). Como resultado, observou-se que o valor de R_f apresentando pelas manchas correspondentes às subfrações citadas acima, foi o mesmo da quercetina com o valor de 0,9. Sugere-se, então, a presença deste flavonol nos compostos.

Após as análises por CCD das frações e subfrações obtidas do extrato seco AcOEt de *B. trimera*, realizou-se o pré-tratamento do extrato (*clean-up*) e, a seguir, as análises em CLAE –UV, conforme descrito no item 2.3.2.1. Da mesma maneira, realizou-se a análise da subfração 148. As Figuras 17 e 18 mostram os cromatogramas e o espectro UV obtidos para o extrato AcEOt e para a SubFr. 148.

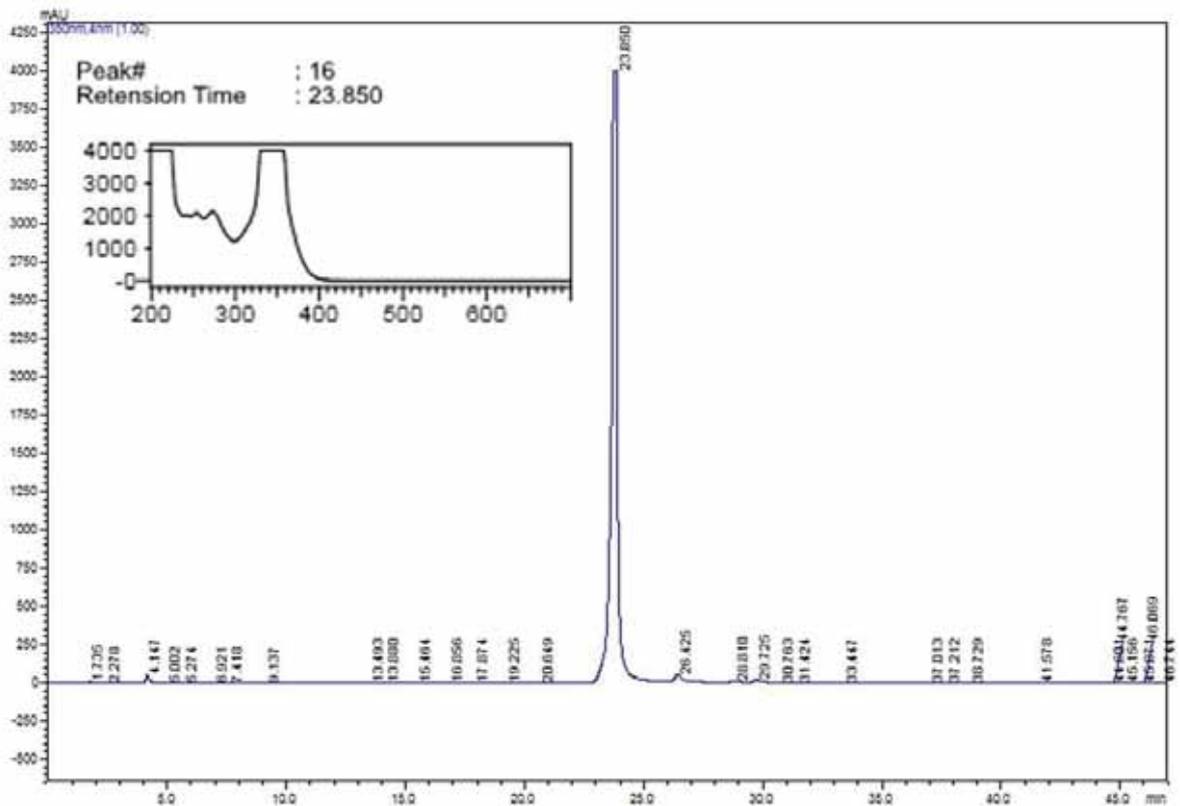
FIGURA 17. Cromatograma do extrato AcOEt de *B. trimera* em 210 nm e espectro UV do pico principal.



FONTE: Dados da pesquisa (2012).

NOTA: Condições de análise descritas no item 2.3.2.1.

FIGURA 18. Cromatograma da SubFr. 148 da CC em 350 nm e espectro UV do pico principal.



FONTE: Dados da pesquisa (2012).

NOTA: Condições de análise descritas no item 2.3.2.1.

A análise da Figura 17 permite a observação do perfil do extrato de *B. trimera*. Nas condições de análise descritas no item 2.3.2.1, demonstrou-se um pico majoritário com t_R em 23, 87 min, que pode estar mascarando outras substâncias presentes no extrato. O espectro UV, apresentou bandas que sugerem tratar-se de um composto fenólico ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 350 nm). A análise da Figura 18, cromatograma e espectro UV da SubFr. 148, também demonstrou a presença de um pico majoritário com t_R em 23,85 min. Sabendo-se que as condições de análise foram as mesmas, os t_R foram praticamente iguais e as bandas no espectro UV foram apresentadas nas mesmas regiões, pode-se afirmar que trata-se da mesma substância. Relacionando-se a CCD desta subfração com o cromatograma obtido, pode-se dizer que a mancha amarela presente na CCD é indicativa da substância ativa de tal subfração e está relacionada com o pico apresentado no cromatograma. A partir destas observações, sugere-se, portanto, que seja um composto fenólico a substância responsável pela atividade leishmanicida deste composto.

3.2. Atividade do extrato, frações e subfrações da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Das 28 subfrações, 8 frações e 1 extrato testados, cinco subfrações e três frações apresentaram interessante potencial leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. As frações ativas foram: Fr. 2 (Hex/AcOEt 95:05), Fr. 3 (AcOEt) e Fr. 4 (AcOEt). Já as subfrações foram as seguintes: SubFr. 44(Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8) , SubFr. 57 (Hex/AcOEt/i-PrOH 87:12,1:0,9), SubFr. 148 (MeOH), SubFr. 149 (MeOH) e SubFr. 80:20 (MeOH/H₂O). Os resultados obtidos em CI_{50} são mostrados na Tabela 4.

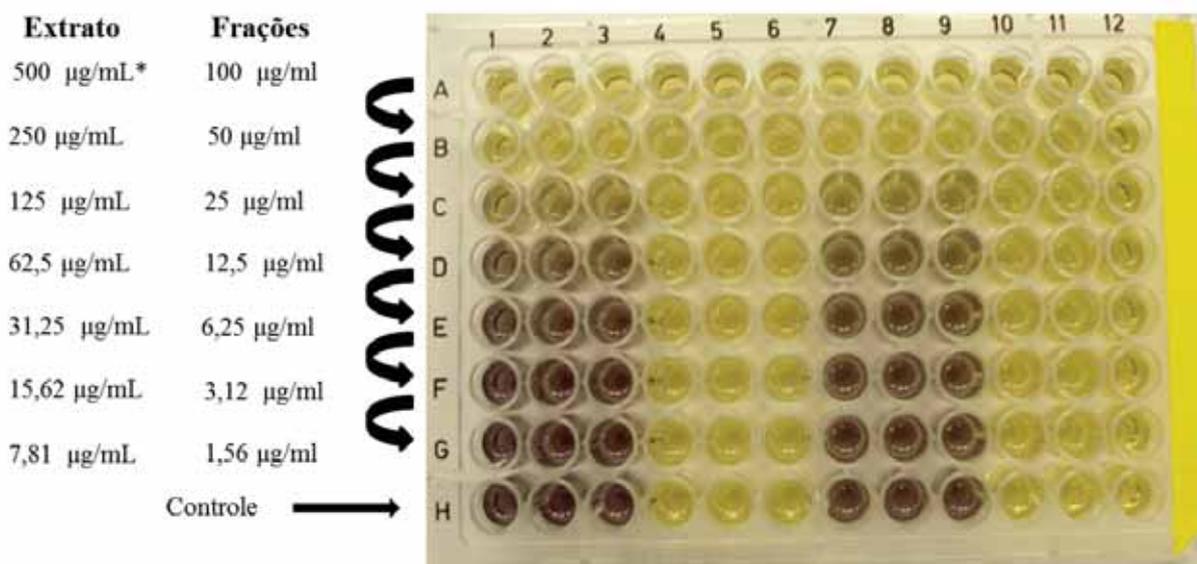
TABELA 4. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (CI₅₀) EM EXPERIMENTOS SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*.

Frações	<i>L. amazonensis</i> CI₅₀ (µg/mL)
Extrato AcOEt	130,18
Fr. 2	23,56
Fr. 3	29,89
Fr. 4	42,31
SubFr. 44	< 1,56
SubFr. 57	5,07
SubFr. 148	< 1,56
SubFr. 149	5,21
SubFr. 80:20	24,61
Pentamidina	4,00

FONTE: Dados da pesquisa (2012).

Os resultados apresentados acima se mostraram interessantes quando comparados com o valor de CI₅₀ da pentamidina, fármaco utilizado com controle. Este fármaco apresentou CI₅₀ = 4 µg/mL, determinado em experimentos realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa. A partir disto, os resultados apresentados pelas Fr. 2, 3 e 4 são considerados interessantes, apesar dos valores de CI₅₀ serem superiores ao da pentamidina, pelo fato de serem compostos que ainda apresentam muitas substâncias diferentes em sua composição. Em relação às subfrações, os valores de CI₅₀ se mostraram ainda mais interessantes, pela proximidade destes valores com o CI₅₀ da pentamidina e também por serem frações mais purificadas, o que diminui a variedade de substâncias em sua composição. Apesar de não serem substâncias puras, os valores de CI₅₀ das subfrações são promissores e justificam a realização de processos de isolamento e caracterização de substâncias a partir destes compostos.

FIGURA 19. Esquema de placa de 96 orifícios após o ensaio colorimétrico de MTT.



FONTE: Dados da pesquisa (2012).

3.3. Atividade de subfrações da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC frente a macrófagos da linhagem J774

A partir dos valores de CI_{50} apresentados anteriormente, foram selecionadas três subfrações para a realização do bioensaio de citotoxicidade frente a macrófagos da linhagem J774. As subfrações selecionadas foram: SubFr. 44, SubFr. 148 e SubFr. 80:20. As SubFr. 44 e 148 foram selecionadas por apresentarem valor de CI_{50} promissor, quando comparado ao da pentamidina, e a SubFr 80:20 por ser uma fração com menos interferentes. Pode-se observar no cromatograma da SubFr. 148 (Figura 18), a presença de uma substância majoritária, representada pelo pico principal, e baixas concentrações de outras substâncias representadas por picos menores. O objetivo do processo de *clean-up*, realizado na obtenção da SubFr. 80:20, foi o de eliminar interferentes presentes na SubFr. 148, representados por picos menores observados no seu cromatograma. Como controle, utilizou-se pentamidina no bioensaio. Os resultados obtidos, expressos em CC_{50} e IS, são mostrados na Tabela 5.

TABELA 1. CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA DE 50% (CC₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) PARA BIOENSAIO REALIZADO COM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774.

Frações	CC₅₀ (µg/mL)	IS
SubFr. 44	> 100	> 64,1
SubFr. 148	> 100	> 64,1
SubFr. 80:20	93,48	3,8
Pentamidina	21,25	5,31

FONTE: Dados da pesquisa (2012).

O Índice de Seletividade é um parâmetro que mede quanto um composto é ativo sobre o parasito, deixando de causar danos à viabilidade das células hospedeiras. Desta maneira, quanto maior for esta razão, mais seletivo será o composto ou substância sobre o parasito e, conseqüentemente, menor será o efeito causado sobre a célula do hospedeiro (FIOCRUZ, 2009). A partir disto, observando-se os valores encontrados para as três subfrações testadas, pode-se dizer que as mais interessantes frente ao valor de IS são a 44 e 148, pois o valor de IS é bastante elevado. No entanto, o índice da SubFr. 80:20, também não se mostrou ruim, pois está próximo ao apresentado pela pentamidina (fármaco controle).

4. Discussão

As plantas são fontes naturais para a pesquisa de novos e seletivos agentes para o tratamento de doenças tropicais causadas por protozoários e outros parasitos. As leishmanioses estão classificadas entre estas doenças e são consideradas doenças negligenciadas. Estas acometem milhares de pessoas ao redor do mundo e caracterizam um grave problema de saúde pública. Poucos são os laboratórios envolvidos com o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento destes tipos de doenças e inexistem vacinas eficazes para promover a imunoprevenção destas infecções. Além disto, os tratamentos disponíveis atualmente são insatisfatórios (GARCÍA *et al.*, 2012). Nos últimos

anos, foram descobertos importantes fármacos derivados de plantas, como a artemisina, quinina e lidocaína. Mas apesar de tais descobertas, ainda existem poucos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento das diversas doenças parasitárias (KAYSER *et al.*, 2003). Mesmo em pequeno número, 60% dos fármacos antitumorais, antibacterianos, antivirais, e antiparasitários comercializados têm sua origem em produtos naturais, assim como alguns fármacos ainda na fase de testes clínicos (SHU, 1998).

A imensa diversidade da flora brasileira incentiva a realização de estudos buscando novos compostos, com potencial antiparasitário, derivados de produtos naturais, que, em geral, apresentam elevado potencial farmacológico e são frequentemente empregados na medicina popular, para tratamento dos mais variados tipos de doenças. Em estudo realizado com cinco plantas brasileiras, da região do rio Paraná, o extrato EtOH obtido de folhas da espécie *Nectandra falcifolia*, conhecida popularmente como “canelinha”, apresentou bom resultado quando testado sobre formas promastigotas de *L. braziliensis* (CI₅₀ = 138, 5 µg/mL). Tal gênero possui muitas espécies na flora brasileira e é utilizado na medicina popular para o tratamento de dor, artrite, reumatismo, diarreia e, ainda, apresentou atividade antimicótica (TRUITI *et al.*, 2005). Em outra pesquisa, utilizando-se plantas do Cerrado brasileiro, o segundo bioma mais importante do país, revelou-se o potencial leishmanicida de outras espécies de plantas brasileiras sobre formas promastigotas de *L. donovani*. Extratos hexânicos e etanólicos foram preparados a partir de raiz, tronco, folhas e frutas de cinco espécies: *Annona crassiflora*, *Himatanthus obovatus*, *Casearia sylvestris* var. *língua*, *Guarea kunthiana*, *Cupania vernalis* e *Serjania lethalis*. A espécie *Casearia sylvestris* var. *língua* apresentou o maior potencial leishmanicida entre as outras espécies testadas, com valores de CI₅₀ variando de 0,1 – 5,0 µg/mL. As espécies restantes também apresentaram interessante atividade leishmanicida e seus valores de CI₅₀ variaram entre 3,7 e 7,9 µg/mL (MESQUITA *et al.*, 2005).

Muitas são as espécies pertencentes ao gênero *Baccharis* e muitas delas podem ser encontradas no Brasil, estando na região sudoeste sua maior concentração (BUDEL, *et al.*, 2003; BUDEL *et al.*, 2005). Espécies variadas exibem propriedades farmacológicas diferentes como: propriedades antibiótica, antisséptica, antiprotozoário, entre outras, e, ainda, podem ser utilizadas para o tratamento de feridas. Tradicionalmente, são empregadas no tratamento de muitas doenças na América do Sul (PASSERO *et al.*, 2011). Foram encontrados na literatura estudos evidenciando a presença de compostos com atividade leishmanicida, isolados a partir de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Baccharis* (GRECCO *et al.*, 2012).

A espécie utilizada neste trabalho apresentou atividade leishmanicida em estudo anterior. Segundo Luize *et al.*, 2005, em um estudo *in vitro* realizado com extratos obtidos a partir de 19 espécies de plantas brasileiras, tradicionalmente empregadas no tratamento de grande variedade de doenças, foram relatados resultados significantes de acordo com o percentual de inibição do crescimento de parasitos, que variou de 49,5% a 99%. A espécie *B. trimera* apresentou atividade moderada frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀ = 85,76 µg/mL e 77,4 µg/mL, respectivamente), quando testado seu extrato hidroalcolico na concentração de 100 µg/mL.

A busca por novas moléculas com potencial leishmanicida pode ser realizada por meio de diferentes métodos utilizando-se formas promastigota, amastigota ou amastigota axênica das diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Entre eles, o mais importante é o método de contagem de formas intracelulares (amastigotas), por utilizar o estágio clinicamente relevante do parasito, responsável pela infecção de células do hospedeiro vertebrado (mamífero). No entanto, tal método apresenta certas limitações como o tempo de duração do bioensaio, o uso de animais para a extração de macrófagos e os possíveis erros de contagem. Apesar do desenvolvimento de um método utilizando formas amastigotas axênicas, mais fácil, rápido e barato que o anterior, a falta de informação sobre o comportamento de macrófagos durante o

tratamento, a possibilidade de influência destas células sobre a atividade do fármaco ou danos decorrentes da toxicidade, dificultam o emprego de tal método na rotina. Portanto, o método mais empregado na pesquisa de novos compostos com potencial atividade antileishmania é aquele utilizando formas promastigotas deste parasito. Mesmo não sendo a forma clinicamente relevante, os bioensaios realizados com o emprego desta forma, permitem a avaliação da seletividade do produto testado por meio de um método fácil e de alta reprodutibilidade (GARCÍA *et al.*, 2012). Baseando-se nesta justificativa, os bioensaios realizados durante esta pesquisa utilizaram formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonensis*, sendo que na etapa final foram utilizados macrófagos da linhagem J774, para a pesquisa de citotoxicidade dos compostos ativos, excluindo o uso de animais neste estudo.

Partindo do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo a busca de novos compostos com potencial leishmanicida a partir de produtos naturais. Avaliou-se a atividade antileishmania, sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, de 37 compostos, sendo 1 extrato, 8 frações e 28 subfrações obtidas a partir de partes aéreas da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC. Deste total, três frações e cinco subfrações apresentaram tal atividade. Três das subfrações ativas também foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade, utilizando-se macrófagos da linhagem J774. Como resultado, observou-se que duas delas apresentaram baixa toxicidade frente a estas células, sendo o valor da terceira, semelhante ao da pentamidina, fármaco utilizado como controle.

As Fr. 2, 3 e 4 obtidas por EFS, a partir do extrato seco AcOEt de *B. trimera*, foram as frações que apresentaram interessante atividade leishmanicida. As Fr. 2 (Hex/AcOEt 95:05) e 3 (AcOEt) apresentaram moderada atividade ($CI_{50} = 23,56 \mu\text{g/mL}$ e $29,89 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), assim como a Fr. 4 (AcOEt), que apresentou atividade pouco menor ($CI_{50} = 42,31 \mu\text{g/mL}$). A partir das Fr. 3 e 4, que apresentaram perfis cromatográficos similares, foram obtidas as subfrações por meio de CC. As cinco subfrações que mostraram atividade

leishmanicida foram: SubFr. 44 (Hex/AcOEt/i-PrOH 89:10,2:0,8), SubFr. 57 (Hex/AcOEt/i-PrOH 87:12,1:0,9), SubFr. 148 (MeOH), SubFr. 149 (MeOH) e SubFr. 80:20 (MeOH/H₂O). As SubFr. 44 e 148 (CI₅₀ < 1, 56 µg/mL) se mostraram bastante interessantes, pelo fato do valor de CI₅₀ de ambas ter se apresentado abaixo do determinado para a pentamidina (CI₅₀ = 4 µg/mL). No entanto, as SubFr. 57 e 149 (CI₅₀ = 5,07 µg/mL e 5,21 µg/mL, respectivamente) também foram interessantes, sendo que os seus valores de CI₅₀ estão próximos ao do fármaco controle. Já a SubFr. 80:20 demonstrou moderada atividade (CI₅₀ = 24,61 µg/mL).

A partir dos valores de CI₅₀ apresentados, foram selecionadas três subfrações para a realização dos testes de citotoxicidade frente a macrófagos da linhagem J774. As subfrações testadas foram: SubFr. 44, SubFr. 148 e SubFr. 80:20. As duas primeiras subfrações foram selecionadas por se mostrarem promissoras (CI₅₀ < 1,56 µg/mL) e, a última, por conter menos impurezas em sua composição. Os IS obtidos demonstraram que as subfrações mais interessantes foram a 44 e 148 (IS > 64,1). Tais resultados podem ser considerados bastante promissores, quando comparados com um estudo *in vitro* realizado com formas promastigotas de *L. amazonensis*, macrófagos peritoneais de ratos BALB/c e extratos etanólicos de 48 plantas. Os valores de IS apresentados por algumas espécies, neste estudo, foram os seguintes: *Hura crepitans* (CI₅₀ = 16,4 µg/mL e IS = 24), *Bambusa vulgaris* (CI₅₀ = 60,49 µg/mL e IS = 5) e *Simarouba glauca* (CI₅₀ = 47,5 µg/mL e IS = 5) (GARCÍA *et al.*, 2012). Pelo fato do valor de IS das subfrações ser ainda maior que o apresentado por estas espécies, confirma-se o interessante resultado apresentado por elas. Já SubFr. 80:20 (IS = 3,8), ao contrário do esperado, apresentou-se pouco promissora, no entanto, o seu índice está próximo ao da pentamidina (IS = 5,31), também utilizada como controle nos bioensaios de citotoxicidade.

Todos os compostos testados na realização deste trabalho foram previamente solubilizados em DMSO, tendo em vista que em estudos realizados com soluções etanólicas de determinados compostos, não foram obtidos os potenciais leishmanicida. Tal fato

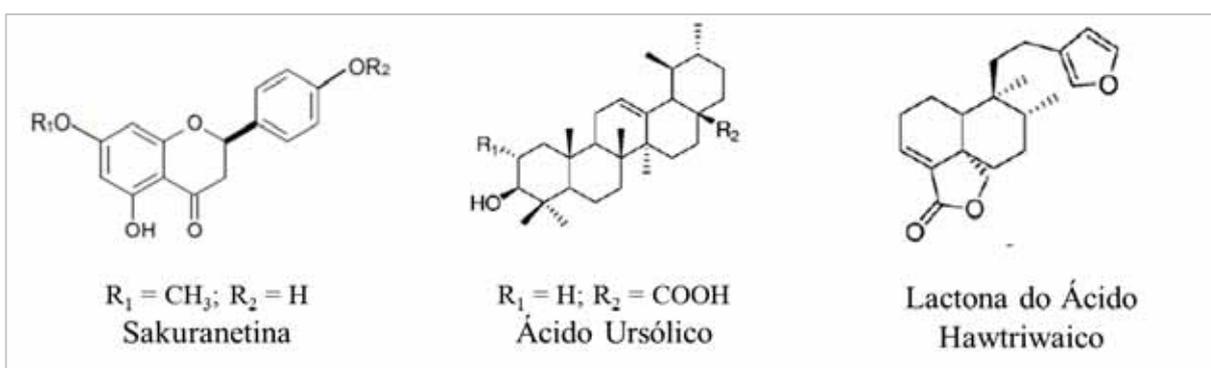
demonstra a importância do solvente. O DMSO funciona como um permeabilizante de membrana celular e auxilia a entrada de fármaco ou de outras substâncias, como os compostos deste estudo, no interior da célula, facilitando sua ação farmacológica (GARCÍA *et al.*, 2012). Por esta razão, somente DMSO foi utilizado como solvente nos bioensaios realizados. Como precaução, para que se garantisse a menor quantidade possível de solventes nos compostos testados, todos eles foram colocados em dessecador sob pressão reduzida antes da realização dos bioensaios.

Para conhecer os constituintes químicos do extrato seco AcOEt e de suas frações e subfrações, foram realizados estudos fitoquímicos por meio de técnicas de fracionamento e análises cromatográficas. As frações e subfrações foram obtidas por EFS e CC e analisadas por CCD e CLAE-UV. A partir destas análises, sugeriu-se que a substância responsável pelo potencial leishmanicida, apresentado pelos compostos testados, está relacionada a um composto fenólico.

De acordo com estudos fitoquímicos encontrados na literatura, compostos fenólicos e terpenoides se destacam em relação ao seu potencial leishmanicida (GRECCO *et al.*, 2012). Em estudo com a espécie *B. retusa*, demonstrou-se que a 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavonona, uma flavonona isolada do extrato MeOH desta planta, apresentou atividade contra espécies de *Leishmania* causadoras das leishmanioses cutâneas. A partir deste mesmo extrato, foram isolados e identificados três flavonoides, sendo que um deles apresentou atividade leishmanicida frente à formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* (CI₅₀ = 51,89 µg/mL, 45,12 µg/mL e 52,60 µg/mL, respectivamente). Tal flavonoide foi identificado como sakuranetina. Por meio da comparação estrutural entre os flavonoides isolados, observou-se que a substância ativa possui, nas posições C-4' e C-7 de sua estrutura, um grupo hidroxil e outro metoxil, que provavelmente estão relacionados à sua atividade antiprotozoário, já que não estão presentes nas substâncias inativas (GRECCO *et al.*,

2012). A espécie *B. dracunculifolia*, também apresentou atividade leishmanicida, quando testado seu extrato hidroalcolico frente a formas promastigotas de *L. donovani* ($CI_{50} = 45 \mu\text{g/mL}$). A partir deste extrato, foram obtidas as seguintes substâncias: o ácido ursólico e a lactona do ácido hawtriwaico, que apresentaram elevada atividade leishmanicida, com valores de CI_{50} de $3,7 \mu\text{g/mL}$ e $7,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Comparando-se a estrutura destas substâncias com sua atividade antiparasitária, revelou-se que grupos hidroxila, presentes nas posições C-2 e C-3 do ácido ursólico, relacionam-se com sua atividade leishmanicida, sendo que além de atuar frente a *L. donovani*, também é ativa frente a *L. amazonensis*; assim como, sugeriu-se que o anel lactona presente na substância lactona do ácido hawtriwaico tem relação com a melhora da atividade leishmanicida demonstrada pelos diterpenos clerodânicos (SILVA FILHO *et al.*, 2009). Desta maneira, pode-se concluir que a atividade antileishmania destes compostos tem relação estrutural. Além disto, confirma-se a suspeita de que a substância ativa presente nos compostos testados pode estar relacionada a um composto fenólico, já que tais compostos são frequentemente encontrados no gênero *Baccharis*.

FIGURA 20. Estrutura de algumas substâncias que apresentaram potencial leishmanicida, segundo a literatura.



FONTE: GRECCO *et al.*, 2012; SILVA FILHO *et al.*, 2009.

5. Conclusão

Com este trabalho foi possível avaliar o potencial leishmanicida apresentado pela espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC. A partir do extrato AcOEt e de suas frações e subfrações, determinou-se o valor de CI_{50} frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* de muitos compostos. Os mais promissores foram testados sobre macrófagos da linhagem J774 em estudos de citotoxicidade, fundamentais, tendo em vista que o ativo atua diretamente sobre a célula do hospedeiro no combate à forma amastigota do parasito. A partir deste estudo, foram obtidas as seguintes conclusões:

- ✓ A partir do valor de CI_{50} apresentado pelo extrato AcOEt ($CI_{50} = 130,18 \mu\text{g/mL}$) e comparando-se com o valor encontrado na literatura para outras espécies de plantas com potencial leishmanicida, conclui-se que a espécie estudada também apresenta tal potencial e pode resultar em ativos bastante interessantes para o tratamento das leishmanioses e outras doenças parasitárias;
- ✓ O melhor solvente para solubilizar os compostos estudados foi o DMSO, tendo em vista que na literatura foram encontradas evidências de interação do solvente com os compostos estudados e/ou com as células utilizadas no estudo;
- ✓ As Fr. 2, 3 e 4 ($CI_{50} = 23,56 \mu\text{g/mL}$, $29,89 \mu\text{g/mL}$ e $42,31 \mu\text{g/mL}$), entre todas as frações, foram as que apresentaram atividade antileishmania mais interessante. Seus valores de CI_{50} são promissores, levando em consideração que as três frações ainda são misturas de muitas substâncias e apresentaram CI_{50} não muito discrepantes ao da pentamidina;
- ✓ As SubFr. 44 e 148 ($CI_{50} < 1,56 \mu\text{g/mL}$) foram as que apresentaram melhor atividade leishmanicida, mostrando valores de CI_{50} abaixo ao da pentamidina. Quando testadas sobre macrófagos da linhagem J774, também se mostraram interessante devido ao seu elevado índice de seletividade, o que as caracterizam como pouco ou não citotóxicas;

- ✓ A SubFr. 80:20 não mostrou bons resultados, quando testada sobre formas promastigotas do parasito ($CI_{50} = 24,61 \mu\text{g/mL}$) e macrófagos da linhagem J774 (IS = 3,8), ao contrário do que se esperava;
- ✓ A partir das análises por CCD e CLAE-UV realizadas, suspeita-se que o ativo presente na espécie *B. trimera*, esteja relacionado a um composto fenólico. Bandas do espectro UV do extrato e da SubFr. 148 sugerem a presença de tal composto. Além disto, evidências encontradas na literatura, relacionam o potencial leishmanicida de espécies do gênero *Baccharis* a este tipo de composto;
- ✓ Processos de purificação são necessários para a remoção impurezas das subfrações testadas, na tentativa de isolar ativos presentes nestes compostos;
- ✓ Após o isolamento, processos de caracterização (espectroscopia no infravermelho, espectroscopia no ultravioleta, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e/ou espectrometria de massas) podem ser realizados para a identificação da substância ativa.

6. Referências Bibliográficas

BARRAL, A.; PEDRA-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R. BADARO, R. BARRAL-NETTO, M. CARVALHO E. M.; JOHNSON JÚNIOR, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. of Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BERG, K.; ZHAI, L.; CHEN, M.; KHARAZMI, A. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. **Parasitol Res**, v. 80, n. 3, p. 235-239, 1994.

BOLHASSANI, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; ZAMANILUI, S.; ZAHEDIFARD, F.; SEYED, N.; TORKASHVAND, F.; VAZIRI, B.; RAFATI, S. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 3, p. 637-645, 2011.

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G.; MENEZES JUNIOR, A.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A. S.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) e isolamento de flavona. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.

BRASIL. Ministério da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atualizada. Brasília - DF, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfonatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 75-85, 2009.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; CUNHA, L. M. Macro e microscopical identification of four species of *Baccharis* from trimera group. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl., p. 42-43, 2003.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I – estudos botânicos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

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

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 599-618, 2001.

CHAN-BACAB, M. J.; BALANZA, E.; DEHARO, E.; MUÑOZ, V.; GARCÍA, R. D.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 86, n. 2-3, p. 243-247, 2003.

CORADIN, L.; SIMINKI, A.; REIS, A. (Org). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial plantas para o futuro – Região Sul. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. p. 934.

CUNHA, L. C.; ALVES, L. D. S.; SANTANA, L. C. L. R.; NUNES, G. B. L.; ROLIM NETO, P. J. A Própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de Chagas e leishmaniose. **Rev. Patol. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 105-124, 2011.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; MANGRUM, J. B.; FARREL, N. P. Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs. **Chem. Commun. (Camb)**, n. 39, p. 4828-30, 2008.

DNDi América Latina. Drugs for neglected diseases initiative. 2010. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/panorama.html>>.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Parasitol. Res.**, v. 96, n. 4, p. 216-223, 2005.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 2.

FIOCRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Agência Fiocruz de Notícias. 2009.

Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2642&sid=9>>.

FUNARI, C. S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GARCÍA, M.; MONZOTE, L.; SCULL, R.; HERRERA, P. Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. **ISRN Pharmacol.**, v. 2012, doi: 10.5402/2012/104540.

GIANELLO, J. C.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; PETENATTI, M. E.; PETENATTI, E. M.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos herbários em el centro-oeste argentino. II. “Carquejas”: control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2000.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRECCO, S. S.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R. L. O. R.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M. J. P.; FÁVERO, O. A. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Exp. Parasitol.**, v. 130, n. 2, p. 141-145, 2012.

HERZ, W.; PILOTTI, A-M; SÖDERHOLM, A-C; SHUHAMA, I. K.; VICHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. **J. Organ. Chem.**, v. 42, n. 24, p. 3913-3917, 1977.

JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem-Biol. Interact.**, v. 150, p. 243-251, 2004.

JHA, T. K.; OLLIARO, P.; THAKUR, C. P. N.; KANYOK, T. P.; SINGHANIA, B. L.; SINGH, I. J.; SINGH, N. P. K.; AKHOURY, S.; JHA, S. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. **BMJ**, v. 316, n. 7139, p. 1200-1205, 1998.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol. Res.**, v. 90 Suppl 2, p. S55-62, 2003.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 41, n. 1, 2005.

MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 1, p. 123-128, 2007.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, doi: 10.1155/2010/617521.

MANDAL, G.; SARKAR, A.; SAHA, P.; SINGH, N.; SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 46, n. 1, p. 86-92, 2009.

MATTOS JÚNIOR, D. G.; PINHEIRO, J. M.; MENEZES, R. C.; COSTA, D. A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MESQUITA, M. *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Editora Atheneu, ed. 11, 2005, p. 41-46.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol. Rev.**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.2560-2564, 1998.

OLIVIER, M.; BADARÓ, R.; MEDRANO, F. J.; MORENO, J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Annals Trop. Med. & Parasitol.**, v. 97, suppl. n. 1, p. 79-98, 2003.

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

OUAKAD, M.; VANAERSCHOT, S.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; SPEYBROECK, N.; KESTENS, L.; BOEL, L.; DONCKER, S.; MAES, I.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J. C. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1392-1399, 2011.

p. 85-94, 2005.

PASSERO, L. F. D.; BONFIM-MELO, A.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, D. O.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; GRECCO, S. S.; ZALEWSKY, C. A.; LAGO, J. H. G. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). **Parasitol. Res.**, v. 108, n. 3, p. 529-536, 2011.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes – RJ. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl. 1, p. 37-40, 2004.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JÉSUS, M.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIMÃO, J. Q.; COLOMBO, F. A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; TEMPONE, A. G. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Exp. Parasitol.**, v. 130, n. 3, p. 195-199, 2012.

REY, L. Gaspar Vianna e a descoberta do tratamento das leishmanioses pelos antimoniais. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 4, p. 1-7, 1962.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.

SANTOS, T. C. C.; CÂMARA, J. B. D (Org.). O estado do meio ambiente no Brasil: o estado da biodiversidade. In: ----- . **Geo Brasil 2002**: perspectivas do meio ambiente no Brasil. Brasília: Edições IBAMA, 2002. p. 32-47. Disponível em: <<http://www.uff.br/cienciaambiental/biblioteca/geobrasil/biodiversidade.pdf>>.

SARAIVA, E. M.; PIMENTA, P. F.; BRODIN, T. N.; ROWTON, E.; MODI, G. B.; SACKS, D. L. Changes um lipophosphoglycan and gene expression. Associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 111, n. 3, p. 275-287, 1995.

SERENO, D.; SILVA, A. C.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Int.**, v. 56, n. 1, p. 3-7, 2007.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 972-976, 1997.

SHEPHERD, G. J. Plantas terrestres. In: LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 2003. p. 145-185. Disponível em <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/Aval_Conhec_Cap7.pdf>.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA FILHO, A. A.; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; SANTOS, F. F.; PAULETTI, P. M.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; GREGÓRIO, L. E.; BASTOS, J. K.; NANAYAKKARA, N. P. D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478-82, 2009.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SINHA, S.; SUNDARAM, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, A. Antimony resistance during Visceral Leishmaniasis: A possible consequence of serial mutations in ABC transporters of *Leishmania* species. **Bioinformation**, v. 6, n. 3, p. 107-110, 2011.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; SONG, O.; OH, H.; SOHN, J.; YANG, G.; NAM, J.; JANG, J.; CECHETTO, J.; LEE, C. B.; MOON, S.; GENOVESIO, A.; CHATELAIN, E.; CHRISTOPHE, T.; FREITAS-JÚNIOR, L. H. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 5, p. e675, 2010.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços na quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 6, p. 593-598, 2002.

THAKUR, C. P.; KUMAR, M.; PANDEY, A. K. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 45, n. 4, p. 435-441, 1991.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M.; TITUS, R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 5, p. 1592-1598, 1991.

TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, M. T.; ROQUE, N. F.; LANDMAN, M. T. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

TRUITI, M. C.; FERREIRA, I. C. P.; ZAMUNER, M. L. M.; NAKAMURA, C. V.; SARRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 12, p. 1873-1878, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Initiative for Vaccine Research (IVR). 2012. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html>.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>.

YAMEY, G.; TORRELE, E. The world's most neglected diseases. **BMJ**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002.

ZHAO, C.; PAPADOPOULOU, B.; TREMBLAY, M. J. *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 α . **J. Immunol.**, v. 172, p. 3086-3093, 2004.