

KAROLINE MATHIAS LEITE

**Busca de atividade leishmanicida de substâncias
obtidas de plantas**

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

PARASITOLOGIA CLÍNICA

MONOGRAFIA

Busca de atividade leishmanicida de substâncias obtidas de plantas

Trabalho de Conclusão de Curso com apresentação ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista, para obtenção
do grau de Farmacêutico-Bioquímico

Graduanda: Karoline Mathias Leite

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Aparecida Silva Graminha

Araraquara

2012

Dedicatória

À minha mãe Maristela, exemplo de força, coragem e caráter.

Obrigada pelo seu amor tolerante, disponível e resistente,
que me permite seguir em frente.

Agradecimentos

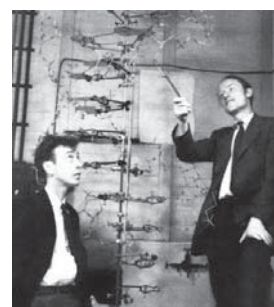
À minha orientadora Graminha, pelo apoio, paciência e confiança de sempre.

Exemplo de pesquisadora, docente, mulher e mãe. Obrigada.

À Belzinha, pelas horas de bancada junto a mim, obrigada pelos ensinamentos.

Levarei comigo somente boas lembranças dos nossos anos de trabalho conjunto.

Só tenho a agradecer, obrigada!



*“...não era ciência muito difícil, somente uma maravilhosa resposta’
que se mostrou ‘tão correta
quanto a (teoria da) evolução...”
Watson e Crick*

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Leishmanioses	11
1.2 Epidemiologia.....	13
1.3 Morfologia	15
1.4 Ciclo de vida.....	16
1.5 Terapêutica	18
1.6 Estudos com produtos naturais.....	20
1.7 <i>Pterogyne nitens</i>	21
1.8 Ensaio colorimétrico MTT (<i>Methyl Thiazolyl Blue</i>)	22
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Meios, soluções e reagentes	23
3.1.1 Para cultivo de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	23
3.1.2 Para cultivo da linhagem contínua de macrófagos J774.....	24
3.1.3 Para método colorimétrico	24
3.2 Frações e substâncias isoladas de <i>P. nitens</i>	25

3.3 Parasitos	26
3.4 Macrófagos J774.....	27
3.5 Incubação das células com as substâncias obtidas de <i>P.nitens</i> e ensaio colorimétrico MTT	27
3.5.1 Promastigotas	28
3.5.2 Macrófagos J774	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Curvas de crescimento de <i>L.amazonensis</i> e <i>L.chagasi</i>	31
4.2 Avaliação da atividade leishmanicida.....	33
4.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos J774.....	37
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMO

Diante da baixa eficácia e elevada toxicidade apresentada pelos fármacos antimoniais e anfotericina B, faz-se premente a pesquisa de novos agentes leishmanicidas. Para tanto, produtos naturais e sintéticos têm sido estudados na busca de novos protótipos antiparasitários. Este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo avaliar a potencial ação leishmanicida de substâncias obtidas de *Pterogyne nitens* contra formas promastigotas de *Leishmania Amazonensis* e *Leishmania chagasi* e a ação citotóxica contra macrófagos da linhagem contínua J774. As amostras testadas, cedidas pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), foram obtidas por meio de técnicas de extração das diferentes partes da planta (flores, folhas e caule). Os ensaios biológicos em promastigotas e macrófagos J774 foram realizados pelo método colorimétrico utilizando-se MTT (*Methyl Thiazolyl Blue*). A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada para determinação da Concentração Inibitória 50% (CI50). Os resultados foram comparados aos fármacos atualmente preconizados como segunda escolha de tratamento pelo Ministério da Saúde (pentamidina e anfotericina B), de acordo com o Manual de Vigilância das Leishmanioses, divulgado no portal do Ministério da Saúde. Os resultados obtidos corroboram o potencial farmacológico notável das substâncias obtidas de *P. nitens* para o uso terapêutico em doenças negligenciadas, tal como a leishmaniose.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS: *Acquired immunodeficiency syndrome*
- CI50: concentração inibitória de 50% dos microorganismos ou células
- CO₂: dióxido de carbono
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DO: densidade óptica
- Fr aq: fração aquosa
- Fr BuOH: fração butanólica
- Fr Hex: Fração hexânica
- Fr Aco: Fração acetato de etila
- GPI: glicosil-fosfatidil-inositol
- HIV: Human immunodeficiency virus
- KCl: cloreto de potássio
- kDNA: DNA mitocondrial
- LPG: lipofosfoglicano
- LIT: *liver infusion tryptose*
- MTT: *methyl thiazolyl blue*
- MM: massa molar
- NaCl: cloreto de sódio

- Na_2HPO_4 : bicarbonato de sódio
- NuBBE: Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
- PMS: metossulfato de fenazina
- RPMI: meio *Roswell Park Memorial Institute*
- SDS: dodecilsulfato de sódio
- WHO: *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Total de medicamentos desenvolvidos no período de 1975 e 2004	11
Figura 2: Principais manifestações clínicas da Leishmaniose. Leishmaniose cutânea (A); Leishmaniose cutâneo mucosa (B); Leishmaniose visceral (C) e Leishmaniose cutânea difusa (D). (Manual de Vigilância da Leishmaniose – Ministério da Saúde, 2007),	13
Figura 3: Dados humanos confirmados no Brasil, no ano de 2008. (Fonte: Ministério da Saúde/SVS, 2008).....	14
Figura 4: Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp: promastigotas, flagelada e extracelular e amastigotas, intracelular e sem movimentos.	16
Figura 5: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp no vetor invertebrado e no hospedeiro acidental.....	18
Figura 6: <i>Pterogyne nitens</i> . Em detalhe, suas folhas.	22
Figura 7: MTT é reduzido à formazan pela ação enzimática de células vivas.	23
Figura 8 - A: Curvas de crescimento de promastigotas de <i>L.amazonensis</i> . ..	32
Figura 9: Curvas de crescimento de promastigotas de <i>L.chagasi</i>	32
Figura 10: Imagens de microscopia óptica da substância nitensidina B (CI ₅₀ =0,68 µg/mL) em diferentes concentrações	33
Figura 11: Exemplo de placa com teste colorimétrico MTT, com testes em triplicata, comparando uma substância sem ação a uma com ação sobre as células.....	34
Figura 12: Estruturas químicas das oito substâncias selecionadas para teste em macrófagos J774 e suas respectivas massas molares, em g/mol.....	38

LISTA DE TABELAS

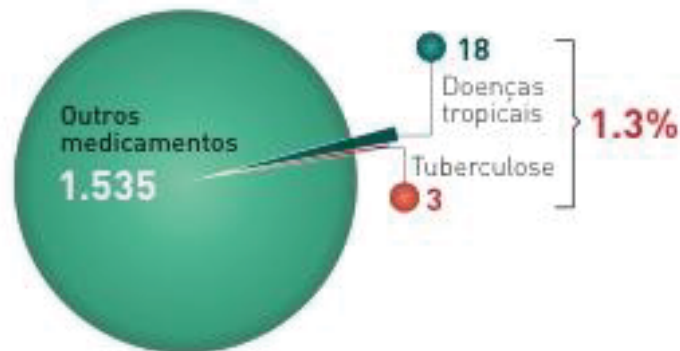
Tabela 1: Frações e substâncias isoladas testadas frente às promastigotas de <i>L.amazonensis</i> e <i>L.chagasi</i>	25
Tabela 2: Cálculo do CI50 das substâncias testadas frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	34
Tabela 3: Cálculo do CI50 das substâncias testadas frente às formas promastigotas de <i>L. chagasi</i>	36
Tabela 4: Cálculo do CI50 das substâncias puras testadas frente aos macrófagos J774.....	38
Tabela 5: Comparação dos valores de CI50 das substâncias puras em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L.chagasi</i> e macrófagos J774.....	39
Tabela 6: Razão entre CI50 de macrófagos J774 e promastigotas de ambas as espécies.....	40

1. INTRODUÇÃO

A prevenção de certas doenças parasitárias depende da associação de diversos fatores, tais como, medidas ecológicas, sanitárias e emprego de fármacos eficazes e seguros (FRAYHA, SMYTH *ET AL.*, 1997). A eficácia dos fármacos depende, por sua vez, do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia dos parasitos. Com o avanço tecnológico e do conhecimento científico para o entendimento de quase todos os ciclos de vida dos parasitos no homem, torna-se possível atualmente, a realização do processo de planejamento de fármacos de maneira mais racional, enfatizando o mecanismo de ação, com o intuito de atingir alvos específicos e essenciais dos parasitos, minimizando os efeitos deletérios das substâncias para o homem. A caracterização molecular e funcional de fatores de virulência melhorou a compreensão da regulação de funções imunes efetoras fornecendo, não somente uma visão mais detalhada da relação parasito-hospedeiro, mas também indicando caminhos para identificação de novos alvos para intervenção terapêutica (OUAISSI E OUAISSI, 2005). Contudo, apesar destes avanços científicos que permitiram a otimização da busca de novos fármacos, todo esse volume de conhecimento não privilegia pessoas afetadas pelas chamadas doenças negligenciadas. Estas são, em sua maioria, doenças tropicais infecciosas que afligem pessoas pobres, a exemplo das leishmanioses que afetam a população de 88 países, numa taxa de dois milhões de casos por ano e cuja atual quimioterapia disponível está longe de ser satisfatória. Entre 1975 e 2004, apenas 18 medicamentos foram registrados para doenças tropicais, nenhum deles para o tratamento das leishmanioses. Durante o mesmo período, 1.535 medicamentos

foram registrados para outras doenças, como a hipertensão, que já possui investimentos significativos em pesquisa e desenvolvimento. (Figura 1).

**Novos medicamentos desenvolvidos
entre 1975 e 2004: 1.556**



Apenas 21 novos medicamentos, dos 1.556 desenvolvidos para doenças negligenciadas nos últimos 30 anos

(Fonte: Chirac P., Torreale E., Lancet, 12 de maio de 2004, 1560-1561)

Figura 1: Total de medicamentos desenvolvidos no período de 1975 e 2004.

1.1 Leishmanioses

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os parasitos protozoários do gênero *Leishmania* do velho e do novo mundo são responsáveis por manifestações clínicas e epidemiológicas diferentes e, por este motivo, foram considerados entidades nosológicas distintas, causadores da leishmaniose tegumentar americana (cutânea e mucocutânea) e leishmaniose visceral, podendo ser reunidos em quatro grupos: (i) formas que produzem lesões exclusivamente cutâneas, com aparência ulcerativa arredondada,

com borda emoldurada e fundo granuloso, manifestação denominada leishmaniose cutânea (Figura 2-A); (ii) formas tegumentares que se complicam, havendo o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas, particularmente do nariz, palato, boca e faringe, constituindo a leishmaniose cutâneo-mucosa (Figura 2-B); (iii) formas que acometem as vísceras, apresentando tropismo pelo sistema monocítico fagocitário do baço, fígado, medula óssea e dos tecidos linfóides, causando hepatoesplenomegalia, constituindo a leishmaniose visceral (Figura 2-C); (iv) formas que produzem lesões cutâneas difusas, onde as lesões aparecem em surtos periódicos, culminando com a presença de nódulos múltiplos e ricos em parasitos e que surgem tardiamente em pacientes infectados – esta manifestação é chamada de leishmaniose cutânea difusa (Figura 2-D).

Devido à semelhança morfológica muito grande entre as espécies do gênero e as doenças que lhe são atribuídas apresentarem características clínicas e epidemiológicas tão diferentes, há certa dificuldade na classificação e nomenclatura destes parasitos. Cerca de 30 espécies de *Leishmania*, que infectam mamíferos, estão descritas, sendo divididas em (i) espécies que apresentam parte de seu desenvolvimento na porção média e anterior do tubo digestivo do flebotomíneo hospedeiro – classificadas como sub-gênero *Leishmania* (*Leishmania*) e (ii) espécies que possuem uma fase adicional em seu desenvolvimento na porção posterior do tubo digestivo do flebotomíneo – classificadas como sub-gênero *Leishmania* (*Viannia*) (PETERS E KILLICK-KENDRICK, 1987).



Figura 2: Principais manifestações clínicas da Leishmaniose. Leishmaniose cutânea (A); Leishmaniose cutâneo mucosa (B); Leishmaniose visceral (C) e Leishmaniose cutânea difusa (D). (Manual de Vigilância da Leishmaniose – Ministério da Saúde, 2007).

1.2 Epidemiologia

As leishmanioses afetam 12 milhões de pessoas no mundo e colocam em risco aproximadamente 350 milhões (DESJEUX, 2004). Uma situação alarmante pode ser observada no Brasil, onde os casos de leishmaniose cutânea aumentaram cerca de 7,7 vezes em apenas duas décadas, 1980-2000 (Fonte: FUNASA).

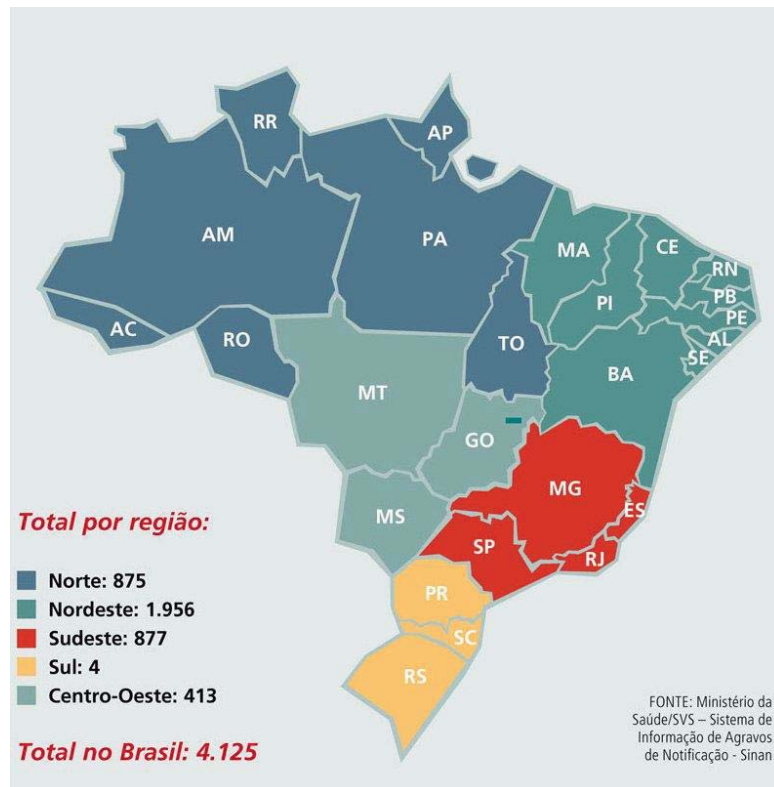


Figura 3: Dados humanos confirmados no Brasil, no ano de 2008. (Fonte: Ministério da Saúde/SVS, 2008).

Em outras regiões do mundo há, também, um claro aumento no número de casos nos últimos anos. Por exemplo, foram reportados 3.900 casos da forma cutânea na Síria em 1998 e 5.900 casos no ano 2000 e no Afeganistão, que apresentava 14.200 casos, e passou a apresentar 200.000 casos em 1999 (WHO, 2002). Além dos casos normalmente relatados, as leishmanioses hoje participam do quadro de doenças oportunistas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em várias áreas do mundo (GRADONI E GRAMICCIA, 1994). Na Europa, usuários de drogas injetáveis constituem o principal grupo de risco apresentando co-infecção *Leishmania*/HIV; no leste da África e na Índia, o problema é frequentemente

associado a imigrantes, trabalhadores com atividade sazonal, refugiados e à prostituição (WHO, 2002). A maioria das co-infecções na América é relatada no Brasil, onde a incidência da AIDS aumentou de 0,8 casos/ 100.000 habitantes em 1986 para 10,5 casos/ 100.000 habitantes em 1997. Em geral, a doença manifesta-se em pacientes imunodeprimidos. No quadro de co-infecções por *Leishmania*, indivíduos HIV-positivos apresentam a forma visceral da doença, todavia a forma cutânea e mucocutânea também são relatadas.

1.3 Morfologia

Os parasitos do gênero *Leishmania* são flagelados da Família Trypanosomatidae Ordem Kinetoplastida, Filo Protozoa. A ordem Kinetoplastida caracteriza-se por apresentar uma mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o kDNA. Esta organela localiza-se anteriormente ao cinetossoma do flagelo, perpendicularmente ao eixo maior do organismo. As características morfológicas dos gêneros que compõem a família Trypanosomatidae são bem homogêneas, sendo que todas as espécies desta família são parasitas. Os tripanosomatídeos apresentam uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários formas celulares bem definidas durante seu ciclo evolutivo. Estes parasitos são digenéticos (heteroxenos) e apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular (Figura 4-A), e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos (Figura 4-B). As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo

entre 14 e 20mm e flagelo livre. As amastigotas têm corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2mm e flagelo interno (Fonte: FIOCRUZ).

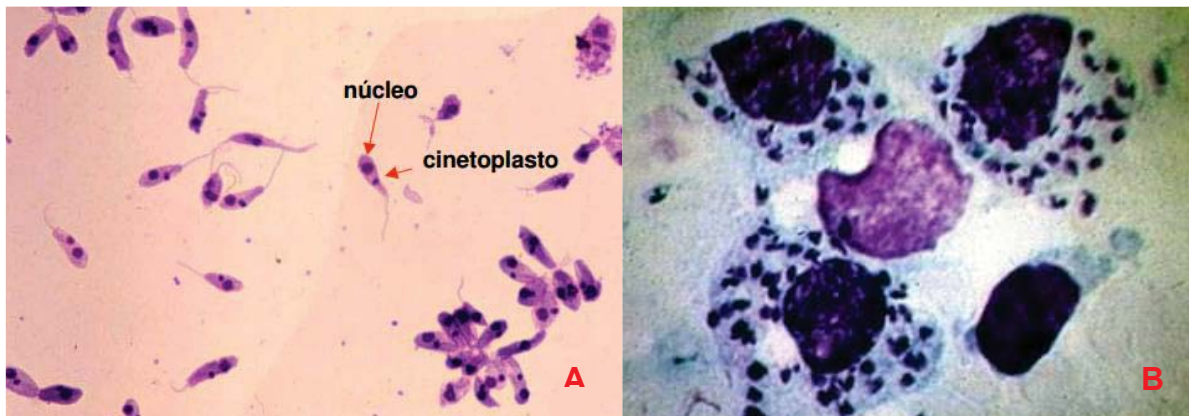


Figura 4: Formas evolutivas de *Leishmania* sp: (A) promastigotas, flagelada e extracelular e (B) amastigotas, intracelular e sem movimentos.

1.4 Ciclo de vida

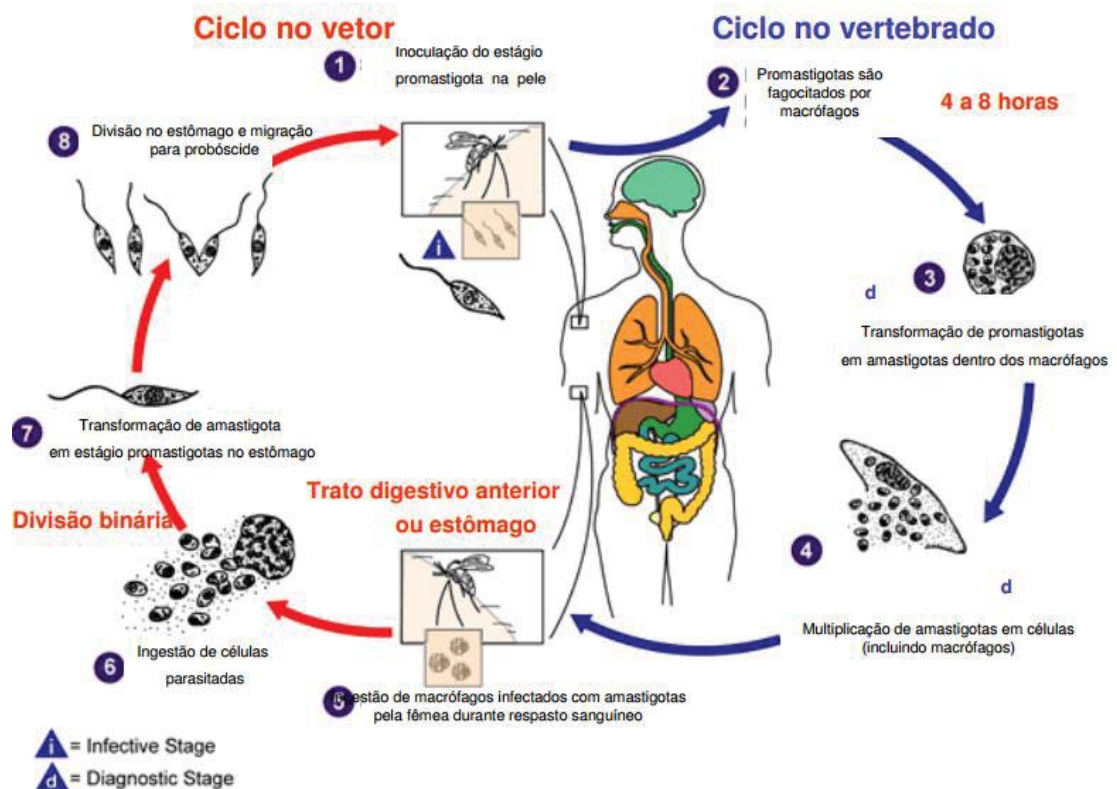
O ciclo de vida das diversas espécies de *Leishmania* é iniciado no trato digestivo de fêmeas do inseto vetor, hematófagas da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. O protozoário é ingerido durante o repasto sanguíneo na forma amastigota, que é liberada com o rompimento das células fagocitárias, e sofre diferenciação para a forma livre, promastigota, que se multiplica por divisão binária. Os promastigotas não infectivos, também denominados procíclicos, aderem-se à membrana peritrófica, produzida pelas células do trato digestivo do inseto, e aí sofrem diferenciação para formas infectivas, denominadas metacíclicas, que perdem a capacidade de aderência por modificação das moléculas de lipofosfoglicano da

superfície do parasito (PIMENTA, TURCO *et al.*, 1992) e assim migram para a probóscide.

Os promastigotas metacíclicos são transferidos para a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado por meio da picada do inseto que, ao mesmo tempo em que suga, injeta saliva que contém várias substâncias farmacologicamente ativas de função conhecida ou não, que melhoram a captação do alimento por efeitos anticoagulante e de vaso dilatação local, melhorando o poder de infecção do parasito (THEODOS, RIBEIRO *et al.*, 1991; CHARLAB, VALENZUELA *et al.*, 1999).

No hospedeiro definitivo, as formas promastigotas metacíclicas interagem com células fagocitárias, principalmente os macrófagos, através de receptores de membrana e são por eles fagocitadas. Moléculas da superfície do parasito como a glicoproteína gp63, majoritariamente presente em algumas espécies de *Leishmania*, e o lipofosfoglicano (LPG), ligado à superfície do parasito através de âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), desempenham um papel fundamental no processo de adesão à célula hospedeira. Estas moléculas são ligantes para componentes do sistema complemento (DA SILVA, HALL *et al.*, 1989). Os receptores de complemento usados pela *Leishmania* (CR1 e CR3) promovem a fagocitose evitando a explosão oxidativa (WRIGHT E SILVERSTEIN, 1983). Dentro dos vacúolos fagocíticos (vacúolo parasitóforo), os promastigotas diferenciam-se em amastigotas que se multiplicam no ambiente hostil do fagolisossomo resistindo aos sistemas hidrolítico e oxidativo dos lisossomos. Após extensa multiplicação do protozoário, a célula parasitada rompe-se e os parasitos liberados são fagocitados por outros macrófagos. O ciclo de vida do parasito se completa quando um inseto

não infectado torna-se vetor do protozoário ao se alimentar do sangue de um vertebrado infectado (MARSDEN, 1979; DESJEUX, 1996). (Figura 5).



(Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

Figura 5: Ciclo de vida da *Leishmania* sp no vetor invertebrado e no hospedeiro acidental.

1.5 Terapêutica

Historicamente, a quimioterapia das leishmanioses baseia-se no uso de metais pesados tóxicos, principalmente compostos antimoniais. Quando este tipo de tratamento não é efetivo, outros fármacos são utilizados incluindo pentamidina e

anfotericina B. Todos esses fármacos necessitam de administração por injeção e supervisão médica ou hospitalização durante tratamento devido à severidade dos possíveis efeitos colaterais. Os fármacos recomendados atualmente para o tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes tais como Estibogluconato de sódio [Pentostam™, GlaxoSmithKline (GSK); <http://www.gsk.com>], N-methylglucamina [Glucantime, Aventis, <http://www.aventis.com>] ou Anfotericina B (Bristol-Myers Squibb; <http://www.bms.com>) e sua formulação lipídica Ambisome® (Gilead; <http://www.gilead.com>) e Pentamidina (Aventis) (WHO, 1995). Estes fármacos são tóxicos e de difícil administração devido à necessidade de longo tempo de utilização e alto custo (DARDARI, LEMRANI *et al.*, 2004). O aumento na taxa de resistência *in vitro* aos antimoniais devido à exposição intermitente, o isolamento de linhagens resistentes de pacientes com leishmaniose cutânea não-responsiva e, recentemente, o aumento no número de casos de leishmaniose visceral em pacientes portadores do vírus HIV tornam urgente a busca por novos fármacos para o tratamento das leishmanioses (ROSA, Mendonça-FILHO *et al.*, 2003).

A patogenia das leishmanioses envolve complexos eventos dos quais se ressaltam a ação sobre macrófagos e/ou atributos de resistência inerentes aos parasitos fagocitados. Os parasitos podem ser efetivamente eliminados por macrófagos ou ter sua capacidade multiplicativa inibida, ou mesmo resistir a todos os mecanismos lesivos da célula macrofágica, mantendo-se viável à multiplicação normal, que culmina no rompimento celular. Disto resulta a importância de se avaliar a ação de substâncias potencialmente leishmanicidas também sobre os macrófagos, no sentido de verificar se são capazes de destruir ou ativar tais células (NORTH,

1978) e/ou serem melhores incorporadas pelas mesmas, atingindo de forma mais eficiente as formas intracelulares desses parasitos.

A quimioterapia atualmente disponível para o tratamento das leishmanioses está longe de ser satisfatória; assim, persiste a necessidade de se obter fármacos alternativos para o tratamento dessas parasitoses.

1.6 Estudos com produtos naturais

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo contando com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas de total estimado entre 350.000 e 550.000. Entretanto, apenas 15 a 17% daquelas catalogadas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Dessas apenas 8% foram avaliadas em suas propriedades terapêuticas. Tal diversidade de espécies vegetais tem despertado enorme interesse de indústrias e de grupos de pesquisa direcionados ao desenvolvimento de novos produtos. Os medicamentos de origem natural formaram a base da atenção à saúde desde os primórdios da humanidade e a despeito do progresso do setor de origem sintética verificado nos últimos anos, o papel que essa fonte natural vem desempenhando é incontestável. Estudos recentes relatam que dentre os vinte fármacos mais prescritos em uso clínico, seis foram de origem natural como artemisinina e paclitaxel, e isso converge cada vez mais a pesquisa na busca de novos protótipos baseados em similaridade com constituintes químicos de plantas (PHILLIPSON, 2001).

1.7 *Pterogyne nitens*

Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae), uma espécie pertencente a um gênero monoespecífico, é popularmente conhecida como "amendoim-do-campo", "amendoim-bravo", "bálsamo", "yvi-raró", "cocal", "tipa" etc. Na América Latina essa espécie arbórea ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. No território brasileiro ocorre com frequência na região de Mata Atlântica e Cerrado, compreendida entre o Ceará até o Paraná (BUKART, 1952).

"Amendoim-bravo", como é popularmente conhecida no estado de São Paulo, é amplamente empregada na construção civil devido às características da sua madeira moderadamente densa e resistente (CARVALHO, 1994). *P. nitens* também conhecida pela beleza e odor de suas flores, bem como pela intensidade de suas folhagens e frutificação possui grande valor ornamental sendo, portanto, recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias e na reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas. Esta espécie habita os remanescentes de vegetação paulista e encontra-se sob risco de extinção, fazendo parte da lista de espécies recomendadas para a conservação genética no estado de São Paulo (LORENZI, 1992).



Figura 6: *Pterogyne nitens*. Em detalhe, suas folhas.

1.8 Ensaio colorimétrico MTT (*Methyl Thiazolyl Blue*)

No ensaio colorimétrico, o MTT, sal tetrazólico, de cor amarelo ouro, pode medir a atividade enzimática celular. Quando este sal tetrazólico entra em contato com células vivas metabolicamente ativas, sofre clivagem pelos cinetoplastos ou mitocôndrias funcionantes formando um produto final roxo escuro chamado formazan, e quanto mais intensa a tonalidade roxo escura, observada pela espectrofotometria, maior o número de células vivas presente na amostra (Figura 7).

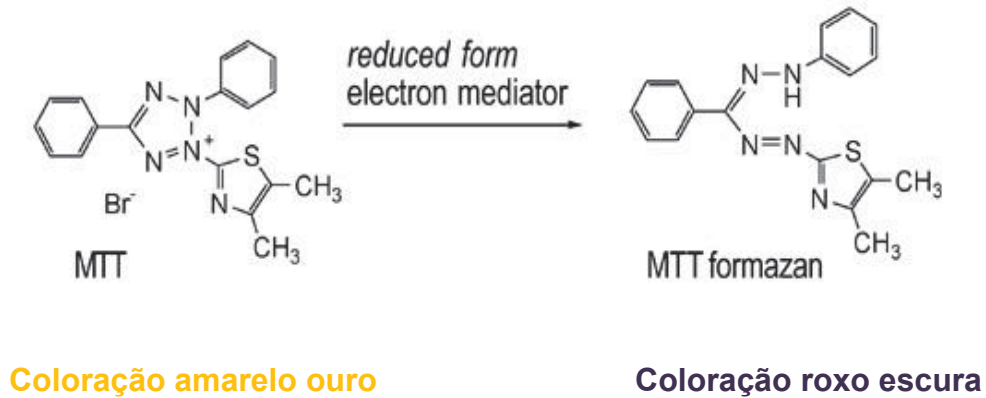


Figura 7: MTT é reduzido à formazan pela ação de enzimas desidrogenases de células vivas.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho de conclusão de curso foi avaliar diferentes frações e substâncias isoladas da espécie *Pterogyne nitens*, obtidas e estudadas pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) do Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara frente às formas promastigotas de duas espécies de *Leishmania* sp (*Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*) e à linhagem contínua de macrófagos J774, utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios, soluções e reagentes

3.1.1 Para cultivo de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

Meio LIT

68.4 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 56.3 mM Na₂HPO₄; 111 mM Dextrose; 0.3% Liver Infusion Broth; 0.5% Tryptose; 25 mg/L Haemin. Incubar a 68 °C por 1 hora e acertar o pH, que deve ser de 7,2. Filtrar em membrana de 0,22 µm. Adicionar 10% de Soro Fetal Bovino estéril.

3.1.2 Para cultivo da linhagem contínua de macrófagos J774

Meio RPMi

Adicionar lentamente o pó em água Milli-Q, sob agitação magnética constante. Depois que o pó estiver totalmente dissolvido, adicionar, por litro, 2 mg de NaHCO₃. Filtrar em membrana de 0,22 µm. Suplementar com 10% de Soro Fetal Bovino Estéril. Conservar em geladeira. No momento do uso, acrescentar os antibióticos penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

3.1.3 Para método colorimétrico

Solução MTT/PMS

Dissolver os pós em água Milli-Q, fracionar em *eppendorfs* e armazenar em *freezer*, separadamente, até o momento do uso.

2,5 mg/mL de MTT/ 0,22mg/mL de PMS (*phenazina methosulfato*)

Solução 10% SDS (*sodium dodecil sulfato*) – 0,01N HCl

3.2 Frações e substâncias isoladas de *P. nitens*

Os extratos, frações e substâncias foram cedidos pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) do Instituto de Química - UNESP - Campus Araraquara. As amostras foram enviadas secas e, no momento do uso, dissolvidas em H₂O milli-Q ou DMSO 100%, de acordo com a solubilidade, na concentração desejada.

Abaixo, a tabela com as substâncias testadas frente às formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania*. As substâncias que são frações, obtidas através de extratos de diferentes partes da planta, como folhas, flores e caule, que são incorporados em diferentes solventes, com separação das moléculas de acordo com suas polaridades, recebem a abreviação Fr + solvente que foi utilizado para extração em frente ao nome. As substâncias puras recebem a inicial (p) em frente ao nome.

Tabela 1: Frações e substâncias isoladas testadas frente às promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

Nit-Cau (Fr Aq)	Nit-Fol(Fr BuOH)	Nit-Accafei(p)	Nit-Nitensitina-A(p)	Nit-Ure-15(p)
Nit-Flor (Fr Aq)	Nit-Cau(Fr ETOH)	Nit-Accloro(p)	Nit-Nitensitina-B(p)	Nit-Ure-8(p)
Nit-Fol (Fr Aq)	Nit-Fol (Fr ETOH)	Nit-Ginina(p)	Nit-Nitensitina-C(p)	Nit-Tio-16(p)
Nit-Cau (Fr Aco)	Nit-Flor(Fr ETOH)	Nit-Ginidina(p)	Nit-Nitensitina-D(p)	Nit-Tio-18(p)
Nit-Flor(Fr Aco)	Nit-Cau (Fr Hex)	Nit-Galegina(p)	Nit-Nitensitina-E(p)	Nit-Ure-19(p)
Nit-Fol (Fr Aco)	Nit-Fol (Fr Hex)	Nit-Farn-Di(p)	Nit-Quercet(p)	-
Nit-Cau(Fr BuOH)	Nit-Flor (Fr Hex)	Nit-Farn-Mono(p)	Nit-Tio-Di(p)	-

Nit-Flor (Fr BuOH)	Nit-Accina(p)	Nit-Isoquer(p)	Nit-Tio-mono(p)	-
--------------------	---------------	----------------	-----------------	---

Fr aq= fração aquosa

Fr BuOH= fração butanólica

Fr Hex= Fração hexânica

Fr Aco= Fração acetato de etila

Nome substância(p) = substância pura (molécula isolada)

3.3 Parasitos

Neste estudo foram utilizados formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* mantidas continuamente no Laboratório de Parasitologia da FCFAr-UNESP, Araraquara.

Optou-se pelo meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), já que o mesmo é rotineiramente preparado em nosso laboratório de Parasitologia. Inicialmente construiu-se uma curva de crescimento da espécie *L. amazonensis* e *L. chagasi*, através da contagem diária em Câmara de Neubauer, com a finalidade de avaliar se o citado meio de cultivo seria apropriado para os experimentos propostos e definir quando (em dias de cultivo) as diferentes fases de crescimento das espécies (fases: início da log, exponencial e estacionária) são alcançadas.

Os dados obtidos foram utilizados para construção de curvas de crescimento (n° de promastigotas x tempo de cultivo em dias) utilizando-se o programa Origin[®] 6.1 (Origin Lab Corporation).

Formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram utilizadas na fase exponencial de crescimento em meio LIT. O número de parasitos foi determinado em câmara de Neubauer. Quando necessário, a suspensão de

parasitos foi centrifugada a 1500xg por 10 minutos a 4°C e, ao pellet foi adicionado LIT a fim de ajustar a concentração de parasitos para as concentrações de 1.10^5 promastigotas/mL.

3.4 Macrófagos J774

Foi utilizada uma linhagem contínua de macrófagos J774, cedida gentilmente pela Prof^a.Dr^a. Clarice Keiko Fujimura Leite, do laboratório de microbiologia da FCFar/UNESP.

Um *pool* de células foi descongelado (estavam armazenadas em *freezer* – 80°C), dispersos em garrafa contendo 20 mL de meio RPMi suplementado e armazenados em estufa de CO₂ 5% por 7 dias. Após este período, as células que ficaram aderidas ao fundo da garrafa foram raspadas com auxílio do *scraper*. O conteúdo foi centrifugado sob refrigeração (20-22°C), a 1500 xg por 10 minutos. O *pellet* formado foi ressuspenso em 2 mL de meio RPMi suplementado e com antibióticos e a concentração de 1.10^5 células/mL foi ajustada com auxílio da Câmara de Neubauer e do corante Trypan Blue 1 %, que cora somente as células mortas (que não são contabilizadas), por sua capacidade de penetrância apenas em poros grandes, inexistentes na célula viva.

3.5 Incubação das células com as substâncias obtidas de *P.nitens* e ensaio colorimétrico MTT

3.5.1 Promastigotas

Com o objetivo de avaliar amostras com atividade biológica contra as espécies de leishmanias, as frações e substâncias isoladas foram incubadas em placas de poliestireno de 96 orifícios Nunc[®], contendo 97µL de uma suspensão de parasitos e 3µL das frações e substâncias isoladas de *P.nitens* em diferentes concentrações finais (100 a 0,02 µg/mL, em diluições seriadas), por 72 horas a 26°C, em triplicata. Como controle utilizou-se os parasitos incubados na ausência de compostos e várias concentrações de compostos na ausência do parasito (para fim de cálculo após resultados de absorção).

Ao final do período de 72 horas de incubação, foram adicionados 10 µL de solução MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL; PMS 0,22 mg/mL) em todos os orifícios e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28°C. Colocou-se então 100 µL da solução SDS 10%, HCl 0,01N, à temperatura ambiente por 30 minutos, também ao abrigo da luz.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (leitor de Elisa - BioRad) a 492 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitos mortos em porcentagem de citotoxicidade (%) foi calculada segundo a equação abaixo (MUELAS-SERRANO, NOGAL-RUIZ et al., 2000).

$$\%C = [(Gc-Gp)/Gc]x100$$

$$Gc = Ac-Am$$

$$Gp = Ap-Apm$$

Sendo que Gc representa o número de parasitos/mL nos poços controles e Gp, o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações de substâncias. Ac corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitos; Am representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito; Ap o valor da absorbância nos testes e Apm, o valor da absorbância das diferentes concentrações de substâncias na ausência do parasito.

Os resultados foram plotados em gráficos do Microsoft Excel 2000 e o CI50 (concentração inibitória de 50% das promastigotas) de cada substância analisada foi determinado por regressão linear, com auxílio do programa Origin[®] 6.1 (Origin Lab Corporation).

3.5.2 Macrófagos J774

Com o mesmo objetivo do teste em promastigotas, as substâncias com resultados mais promissores (somente substâncias isoladas) foram incubadas em placas de 96 orifícios Nunc[®]. Primeiramente, placas contendo 100 µL de uma suspensão 1.10^5 células/mL foram incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ 5%. Após este período, no qual células já aderiram ao fundo da placa, o sobrenadante foi descartado e só então os poços foram completados com 97 µL de meio suplementado e 3µL das substâncias isoladas de *P.nitens* em diferentes concentrações finais (100 a 0,02 µg/mL, em diluições seriadas), por 72 horas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C, em triplicata. Como controle utilizou-se os macrófagos incubados na ausência de compostos.

Ao final do período de 72 horas de incubação, o meio dos 96 poços foi trocado por um meio novo (para evitar a interferência das cores das substâncias na leitura) e posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL; PMSF 0,22 mg/mL) em todos os orifícios e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 37°C, CO₂ 5%. Colocou-se então 100 µL da solução SDS 10%, HCl 0,01N, à temperatura ambiente por 30 minutos, também ao abrigo da luz.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (leitor de Elisa - BioRad) a 392 nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitos mortos em porcentagem de citotoxicidade (%) foi calculada de forma mais simples que para o ensaio das promastigotas, uma vez que o meio foi trocado, evitando a interferência das cores das substâncias durante a leitura. Essa troca de meio somente é possível para o ensaio dos macrófagos J774 pois ao contrário das promastigotas, que ficam em suspensão, essas células são de aderência, possibilitando a retirada do meio sem a retirada das células.

A porcentagem de parasitos mortos em porcentagem de citotoxicidade (%) foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\%C = [(Gc-Gp)/Gc] \times 100$$

Sendo que Gc representa o número de células/mL nos poços controles e Gp, o número de células/mL detectados em diferentes concentrações de substâncias.

Os resultados foram plotados em gráficos do Microsoft Excel 2000 e o CI50

(concentração inibitória de 50% dos macrófagos) de cada substância analisada foi determinado por regressão linear, com auxílio do programa Origin[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curvas de crescimento de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*

As curvas de crescimento de ambas as espécies foram construídas a partir da contagem, em Câmara de Neubauer, do número de promastigotas por mL em 12 dias consecutivos, partindo-se de uma cultura $2 \cdot 10^5$ células/mL.

Além da definição da quantidade de dias de cultivo necessária para alcançar cada fase de crescimento (início da log, exponencial e estacionária), a construção da curva também teve por objetivo definir se o meio de cultura LIT seria apropriado ao cultivo das formas promastigotas.

O resultado foi satisfatório, com um bom crescimento, seguindo as fases descritas na literatura, mostrando que o meio atende às necessidades do protozoário, em sua forma promastigota.

De acordo com os resultados das curvas de crescimento, a espécie *L.amazonensis* atinge sua fase estacionária por volta do 6º dia de cultivo (Figura 8), enquanto a espécie *L.chagasi* apresenta um crescimento um pouco mais lento, chegando à fase estacionária por volta do 8º dia de cultivo (Figura 9). Para realização do experimento, era necessária a utilização do parasito em sua fase exponencial. Para tanto, seguindo as indicações fornecidas pelas respectivas

curvas, os experimentos com *L.amazonensis* foram realizados no 4º dia de cultivo, enquanto os experimentos com *L.chagasi* foram realizados no 6º dia de cultivo.

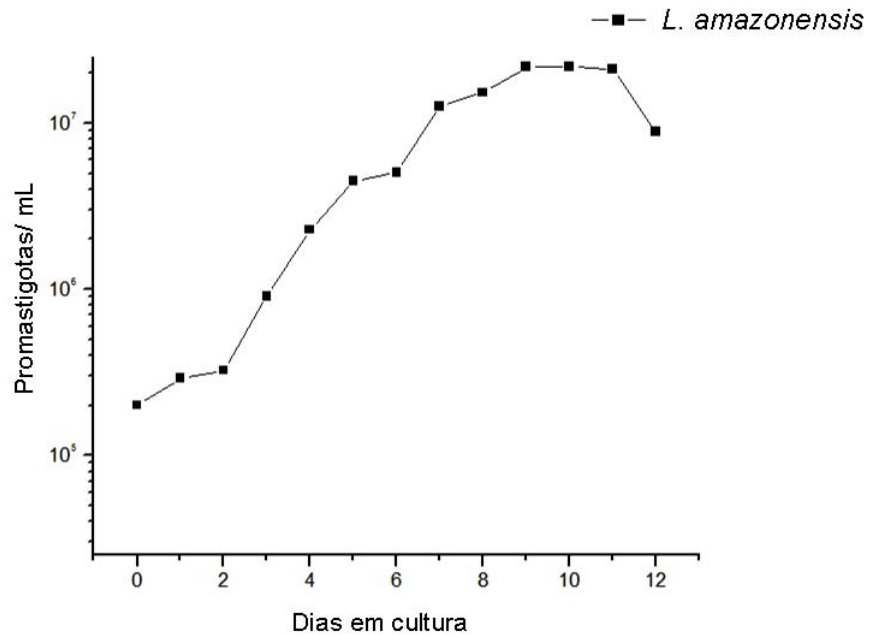


Figura 8: Curvas de crescimento de promastigotas de *L.amazonensis*.

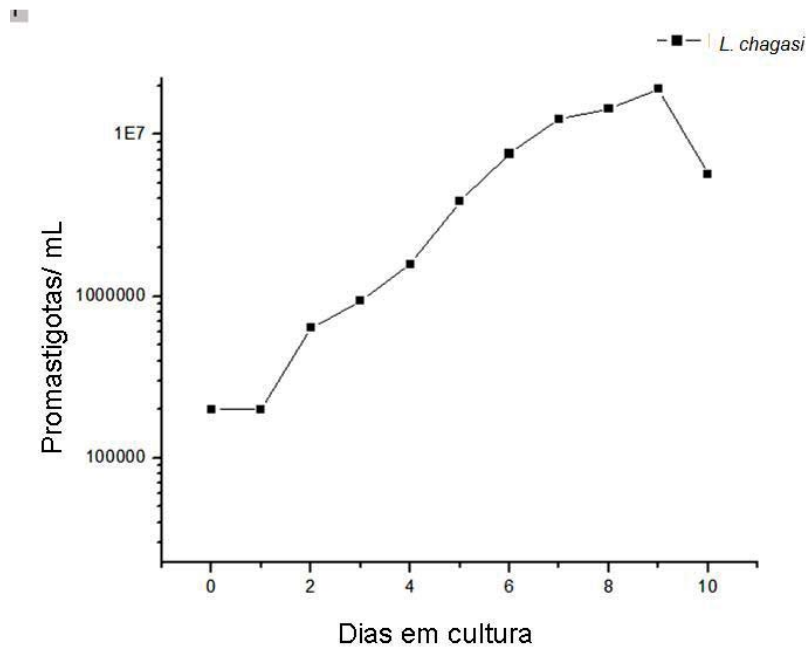


Figura 9: Curvas de crescimento de promastigotas de *L.chagasi*.

4.2 Avaliação da atividade leishmanicida

As substâncias foram avaliadas pelo método colorimétrico MTT padronizado em nosso laboratório frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

As placas de 96 poços foram avaliadas de forma subjetiva, primeiramente ao microscópio óptico, antes do ensaio do MTT (Figura 10) e posteriormente a olho nu, de acordo com o *dégradé* de cores de cada coluna (em triplicata) das placas (Figura 10). A linha H, onde está localizado o controle positivo do experimento, deve conter os poços com maior quantidade de células viáveis, em franca movimentação e de coloração roxa na tonalidade mais escura, uma vez que estes poços não receberam nenhuma substância potencialmente agressiva às células. Os poços da linha A devem apresentar coloração mais clara que os da linha B, que devem ser mais claros que os da linha C e assim sucessivamente, já que a diluição foi realizada de forma seriada (Figura 11).

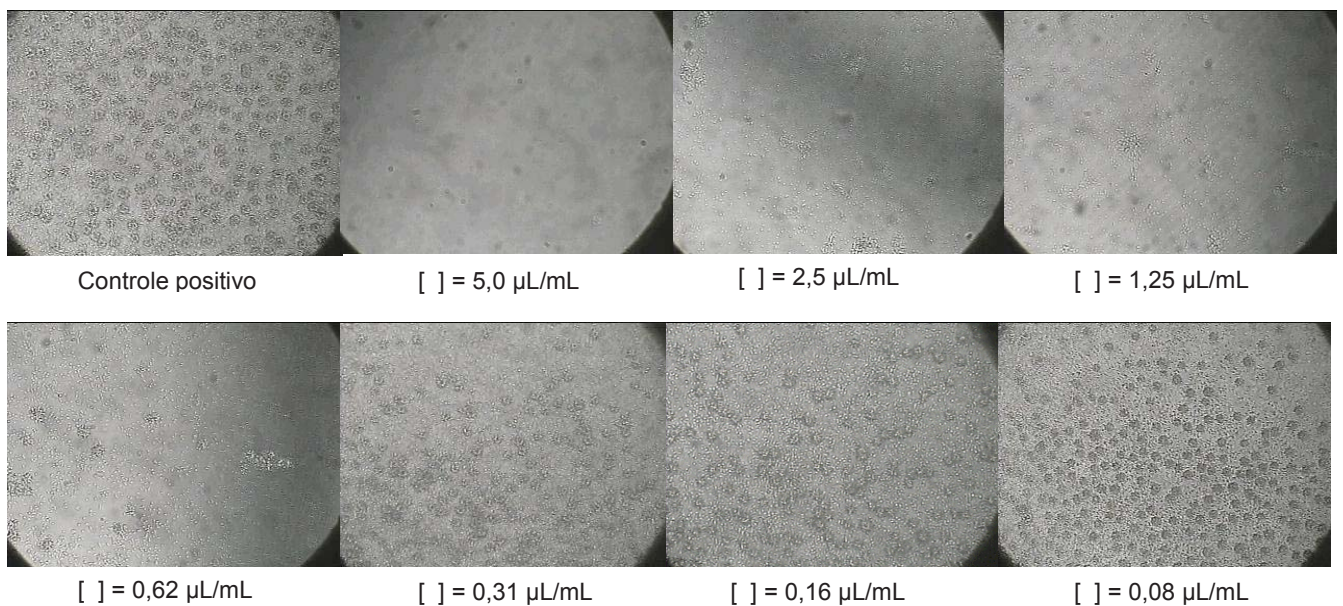


Figura 10: Imagens de microscopia óptica da substância nitensidina B (CI₅₀=0,68 µg/mL) em diferentes concentrações.

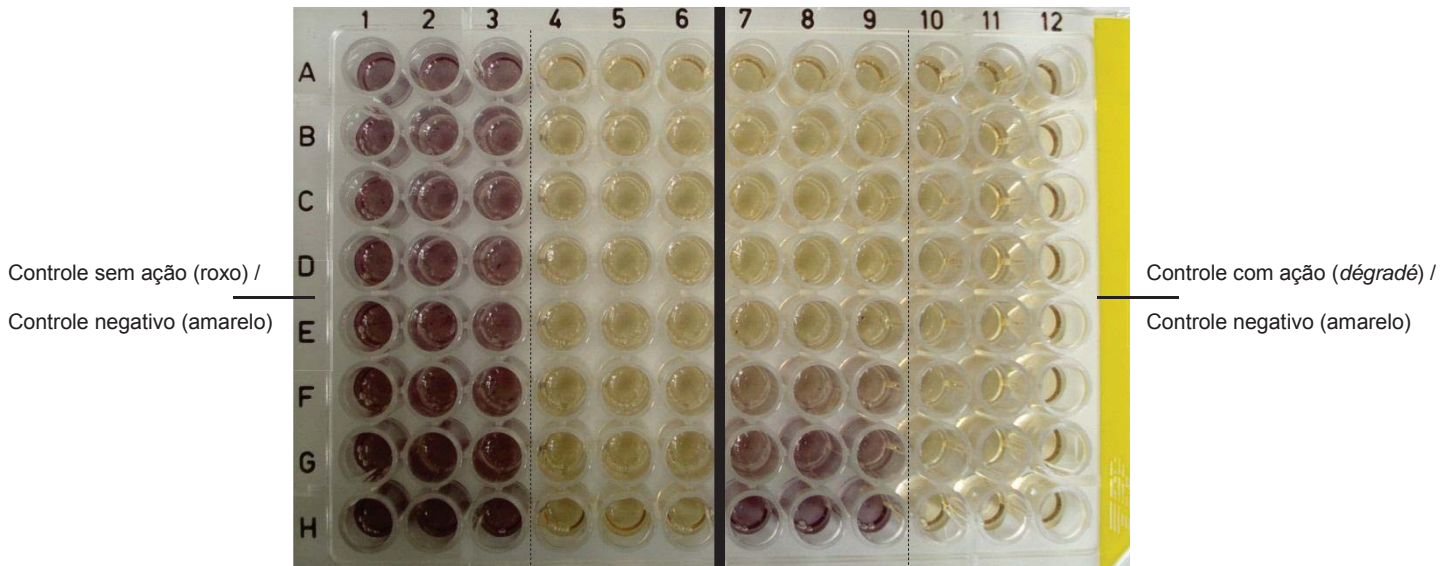


Figura 11: Exemplo de placa com teste colorimétrico MTT, com testes em triplicata, comparando uma substância sem ação a uma com ação sobre as células.

A atividade leishmanicida de cada substância testada pode ser analisada a partir do seu resultado de CI50 (concentração de substância que mata 50% dos parasitos), comparativamente com os resultados da pentamidina e anfotericina B para promastigotas de *L. amazonensis* (4,02 $\mu\text{g/mL}$ e 0,32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e promastigotas de *L. chagasi* (3,03 $\mu\text{g/mL}$ e 0,29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Tabela 2: Cálculo do CI50 das substâncias testadas frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Substância	CI50 (µg/mL)	Substância	CI50 (µg/mL)
Nit-Cau (Fr Aco)	36.31	Nit-Ginidina(p)	1.90
Nit-Flor(Fr Aco)	75.79	Nit-Galegina(p)	3.10
Nit-Fol (Fr Aco)	90.32	Nit-Farn-Di(p)	1.39
Nit-Cau (Fr Aq)	SA	Nit-Farn-Mono(p)	1.20
Nit-Flor (Fr Aq)	SA	Nit-Isoquer(p)	84.06
Nit-Fol (Fr Aq)	SA	Nit-Nitensidina-A(p)	1.12
Nit-Cau(Fr BuOH)	65.72	Nit-Nitensidina-B(p)	0.68
Nit-Flor (Fr BuOH)	66.22	Nit-Nitensidina-C(p)	1.22
Nit-Fol(Fr BuOH)	58.33	Nit-Nitensidina-D(p)	0.70
Nit-Cau(Fr ETOH)	98.53	Nit-Nitensidina-E(p)	1.43
Nit-Fol (Fr ETOH)	39.58	Nit-Quercet(p)	62.00
Nit-Flor(Fr ETOH)	92.86	Nit-Tio-Di(p)	6.20
Nit-Cau (Fr Hex)	AS	Nit-Tio-mono(p)	2.43
Nit-Fol (Fr Hex)	60.65	Nit-Ure-15(p)	AS
Nit-Flor (Fr Hex)	SA	Nit-Ure-8(p)	7.40
Nit-Accina(p)	SA	Nit-Tio-16(p)	9.70
Nit-Accafei(p)	92.20	Nit-Tio-18(p)	10.60
Nit-Accloro(p)	95.88	Nit-Ure-19(p)	16.36
Nit-Ginina(p)	1.90	-	-

Fr aq= fração aquosa

Fr BuOH= fração butanólica

Fr Hex= Fração hexânica

Fr Aco= Fração acetato de etila

Nome substância(p) = substância pura (molécula isolada)

SA = Sem Ação

Tabela 3: Cálculo do CI50 das substâncias testadas frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

Substância	CI50 (µg/mL)	Substância	CI50 (µg/mL)
Nit-Cau (Fr Aco)	7,95	Nit-Ginidina(p)	4.14
Nit-Flor(Fr Aco)	2,89	Nit-Galegina(p)	7.65
Nit-Fol (Fr Aco)	71.84	Nit-Farn-Di(p)	3,09
Nit-Cau (Fr Aq)	SA	Nit-Farn-Mono(p)	3,95
Nit-Flor (Fr Aq)	SA	Nit-Isoquer(p)	ND
Nit-Fol (Fr Aq)	SA	Nit-Nitensidina-A(p)	4.68
Nit-Cau(Fr BuOH)	7,11	Nit-Nitensidina-B(p)	1.65
Nit-Flor (Fr BuOH)	ND	Nit-Nitensidina-C(p)	2.40
Nit-Fol(Fr BuOH)	4.15	Nit-Nitensidina-D(p)	4.11
Nit-Cau(Fr ETOH)	22.84	Nit-Nitensidina-E(p)	1.50
Nit-Fol (Fr ETOH)	16.67	Nit-Quercet(p)	ND
Nit-Flor(Fr ETOH)	ND	Nit-Tio-Di(p)	9.93
Nit-Cau (Fr Hex)	SA	Nit-Tio-mono(p)	1.67
Nit-Fol (Fr Hex)	21.62	Nit-Ure-15(p)	AS
Nit-Flor (Fr Hex)	100.00	Nit-Ure-8(p)	ND
Nit-Accina(p)	ND	Nit-Tio-16(p)	ND
Nit-Accafei(p)	ND	Nit-Tio-18(p)	ND
Nit-Accloro(p)	ND	Nit-Ure-19(p)	ND
Nit-Ginina(p)	0.96	-	-

Fr aq= fração aquosa

Fr BuOH= fração butanólica

Fr Hex= Fração hexânica

Fr Aco= Fração acetato de etila

Nome substância(p) = substância pura (molécula isolada)

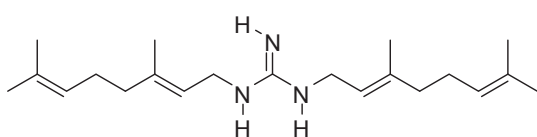
SA = Sem ação

ND = Não determinado

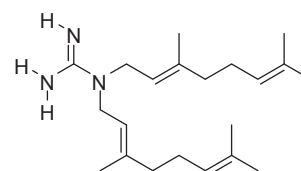
4.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos J774

Após a realização dos testes nas diferentes espécies de promastigotas, as substâncias mais promissoras, ou seja, mais potentes, onde a CI50 foi alcançada nas menores concentrações, foram selecionadas para os testes em macrófagos de linhagem contínua J774. O teste de citotoxicidade em macrófagos é primordial, pois parte do ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado (transformação em amastigota e posterior multiplicação) sendo realizado dentro destas células.

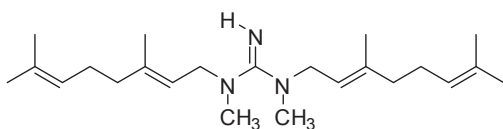
Oito substâncias isoladas foram selecionadas para os testes (Nitensitina A, Nitensitina B, Nitensitina C, Nitensitina D, Ginina, Ginidina e Galegina). (Figura 12).



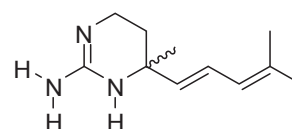
Nitensitina A (MM = 331,3)



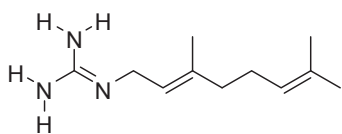
Nitensitina B (MM = 331,3)



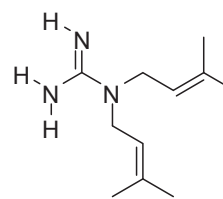
Nitensitina C (MM = 359,33)



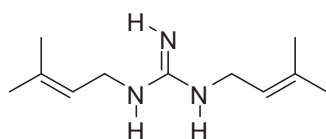
Nitensitina D (MM = 193,16)



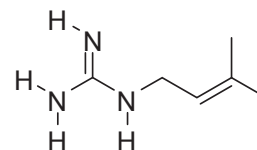
Nitensitina E (MM = 195,3)



Ginina (MM = 195,3)



Ginidina (MM = 195,3)



Galegina (MM = 127,11)

Figura 12: Estruturas químicas das oito substâncias selecionadas para teste em macrófagos J774 e suas respectivas massas molares, em g/mol.

A citotoxicidade de cada substância testada pode ser analisada a partir do seu resultado de CI50 (concentração de substância que mata 50% das células), comparativamente com os resultados da pentamidina e anfotericina B para macrófagos J774 (7,50 µg/mL e 1,29 µg/mL, respectivamente).

Tabela 4: Cálculo do CI50 das substâncias puras testadas frente aos macrófagos J774.

Substância	CI50 (µg/mL)	CI50 (nmol/mL)
Nitensitina A	9,29	28
Nitensitina B	7,96	24

Substância	CI50 (µg/mL)	CI50 (nmol/mL)
Nitensitina C	6,18	17
Nitensitina D	8,45	44
Nitensitina E	3,01	15
Nit - Ginina	2,32	12
Nit - Ginidina	2,51	13
Nit- Galegina	11,1	87

Tabela 5: Comparação dos valores de CI50 das substâncias puras em promastigotas de *L.amazonensis* e *L.chagasi* e macrófagos J774

Substância	CI50 (nmol/mL) <i>L.amazonensis</i>	CI50 (nmol/mL) <i>L.chagasi</i>	CI50 (nmol/mL) J774
pentamidina	1,18	0,89	22
anfotericina B	0,035	0,031	1,4
Nitensitina A	0,34	1,41	28
Nitensitina B	0,21	0,50	24
Nitensitina C	0,34	0,67	17
Nitensitina D	0,36	2,12	44
Nitensitina E	0,73	0,76	15
Nit - Ginina	0,97	0,49	12
Nit - Ginidina	0,97	2,11	13
Nit- Galegina	2,44	6,02	87

Tabela 6: Razão entre CI50 de macrófagos J774 e promastigotas de ambas as espécies

Substância	Razão J774/<i>L.amazonensis</i>	Razão J774 / <i>L.chagasi</i>
pentamidina	18,64	24,72
anfotericina B	40,0	45,16
Nitensitina A	82,35	19,86
Nitensitina B	114,28	48,0
Nitensitina C	50,0	25,37
Nitensitina D	122,2	20,75
Nitensitina E	20,55	19,74
Nit - Ginina	12,37	24,49
Nit - Ginidina	12,40	6,19
Nit- Galegina	35,65	14,45

A análise dos dados nos permite avaliar que as amostras frações testadas em promastigotas são menos potentes quando comparadas às substâncias isoladas. O resultado é coerente, pois as frações apresentam um grande número de moléculas diferentes, que podem ou não apresentar atividade; neste *pool* de moléculas, a concentração da molécula com atividade pode ser baixa, diminuindo a potência da amostra testada quando comparado às substâncias isoladas.

As oito substâncias isoladas testadas frente às formas promastigotas apresentaram resultados satisfatórios. Para *L.amazonensis*, todas as substâncias apresentam um CI50 menor que o da pentamidina (CI50 = 4,02 µg/mL e 3,03 µg/mL, para *L.amazonensis* e *L.chagasi*, respectivamente), ou seja, uma menor concentração destas moléculas consegue inviabilizar a mesma porcentagem de parasitos. Para *L.chagasi*, as substâncias Nitensidina B, Nitensidina C, Nitensidina E e Ginina também apresentaram um CI50 menor que o da pentamidina. Porém, nenhuma substância apresentou CI50 menor que o da anfotericina B (CI50 = 0,32 µg/mL e 0,29 µg/mL, para *L.amazonensis* e *L.chagasi*, respectivamente). Deve-se salientar que a anfotericina B, apesar de apresentar potente atividade contra o protozoário, apresenta baixa seletividade, ocasionando graves efeitos adversos de ordem dermatológica, gastrintestinal, musculoesquelética, pulmonar, cardiovascular (parada cardíaca, arritmia, insuficiência cardíaca e choque) e neurológica (convulsões, neuropatias periféricas, perda de audição e encefalopatia). A substância Ginina apresentou o menor resultado de CI50 para *L.chagasi* e a substância Nitensidina B apresentou o menor CI50 de todas as substâncias, no teste frente à *L. amazonensis*.

Para os testes em linhagem contínua de macrófagos J774 os resultados positivos esperados seriam valores de CI50 maiores que o dos fármacos testados como comparativos (pentamidina e anfotericina B), racional diferente dos testes com promastigotas, onde se espera que os valores de CI50 sejam menores, uma vez que é interessante que o potencial fármaco seja altamente citotóxico (em baixas concentrações) ao parasito e tenha o mínimo de toxicidade nas células do hospedeiro, nas mesmas concentrações. Todas as substâncias isoladas testadas

apresentaram valores de CI50 maiores que o valor de CI50 da anfotericina B. Metade das substâncias puras testadas foi menos tóxica aos macrófagos, quando comparadas à pentamidina (Nitensidina A, Nitensidina B, Nitensidina D e Galegina).

Quanto maior a razão entre o valor do CI50 dos macrófagos e valor do CI50 das promastigotas (para cada espécie) de uma mesma substância, mais promissora como potencial fármaco, pois teoricamente é menos agressiva ao organismo. As substâncias Nitensidina B e Nitensidina E apresentam as maiores razões (11,70 e 12,07, respectivamente, frente à *L.amazonensis*).

5. CONCLUSÃO

As plantas têm se mostrado uma rica fonte de substâncias com atividade contra diferentes microorganismos e se apresentam como alternativa promissora na busca de fármacos eficazes na prevenção e tratamento de doenças tais como as leishmanioses, doença que tem como quimioterapia o uso de metais pesados tóxicos, principalmente compostos antimoniais, além da pentamidina e anfotericina B, que além de graves efeitos adversos, muitas vezes são inefetivos.

Os resultados obtidos corroboram o potencial farmacológico notável das substâncias obtidas de *P. nitens* para o uso terapêutico. As substâncias testadas são bastante promissoras na busca de novos fármacos que sejam efetivos e menos agressivos ao organismo, proporcionando uma melhoria na qualidade do tratamento dos pacientes acometidos pela leishmaniose, protozoose que apesar de fatal, continua a ser negligenciada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frayha, G.J., et al., *The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man*. Gen. Pharmacol., 1997. **28**(2): p. 273-299.
2. Ouaisi, A. and M. Ouaisi, *Molecular basis of Trypanosoma cruzi and Leishmania interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(2): p. 102-14.
3. Peters, W. and R. Killick-Kendrick, *The leishmaniasis in biology and medicine*. 1987, London ; Orlando: Academic. 2 v.
4. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 305-18.
5. Gradoni, L. and M. Gramiccia, *Leishmania infantum tropism: strain genotype or host immune status?* Parasitol Today, 1994. **10**(7): p. 264-7.
6. WHO, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*. Weekly epidemiological record, 2002. **44**: p. 365-372.
7. Pimenta, P.F., et al., *Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut*. Science, 1992. **256**(5065): p. 1812-5.
8. Charlab, R., et al., *Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly Lutzomyia longipalpis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15155-60.
9. Theodos, C.M., J.M. Ribeiro, and R.G. Titus, *Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice*. Infect Immun, 1991. **59**(5): p. 1592-8.

10. da Silva, R.P., et al., *CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages*. J Immunol, 1989. **143**(2): p. 617-22.
11. Wright, S.D. and S.C. Silverstein, *Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes*. J Exp Med, 1983. **158**(6): p. 2016-23.
12. Desjeux, P., *Leishmaniasis. Public health aspects and control*. Clin Dermatol, 1996. **14**(5): p. 417-23.
13. Marsden, P.D., *Current concepts in parasitology. Leishmaniasis*. N Engl J Med, 1979. **300**(7): p. 350-2.
14. WHO. *WHO model prescribing information: drugs used in parasitic diseases*. 1995. GENEVA.
15. Dardari, Z., et al., *Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5 2-(3 2-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study*. Il Farmaco, 2004. **59**: p. 195-199.
16. Rosa, M.S.S., et al., *Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from Croton cajucara*. Antimicrob. Agents Chemother, 2003. **47**: p. 1895-1901.
17. North, R.J., *The concept of activated macrophage*. J. Immunol., 1978. **121**: p. 806-809.
18. Phillipson, J.D., *Phytochemistry and medicinal plants*. Phytochemistry, 2001. **56**: p. 237.
19. Bukart, A. *Las Leguminosas Argentinas*, Aemé Agency: Bueno Aires, 1952.
20. Carvalho, P.E.R, *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira - EMBRAPA - CNPF: Colombo, 1994.*

21. Lorenzi, H; Árvores Brasil: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil; Plantarum: Nova Odessa, 1992.
22. <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>