

A large, spreading tree with vibrant yellow flowers stands in a green field under a clear sky. The tree's branches are dense with small, bright yellow blossoms. The ground is covered in green grass with some yellow wildflowers scattered throughout. The background shows a flat landscape extending to the horizon.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – MIP  
LABORATÓRIO DE PROTOZOLOGIA

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E  
LEISHMANICIDA DE PRODUTOS NATURAIS DA  
FLORA MATO-GROSSENSE**

ACADÊMICA: REBECA KÖRTING NUNES

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO STEINDEL

Florianópolis, junho de 2008

**REBECA KÖRTING NUNES**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE PRODUTOS  
NATURAIS DA FLORA MATO-GROSSENSE**

Trabalho desenvolvido como requisito parcial  
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Florianópolis, junho de 2008.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, orientado pelo Professor Doutor Mário Steindel, em colaboração com o Professor Doutor Luiz Everson da Silva, do Laboratório de Pesquisa Química em Produtos Naturais – LPQPN da Universidade Federal de Mato Grosso.

Dedico este trabalho a meus pais, Marco Antonio e Mirtes, por todo o apoio e incentivo à minha graduação; e a meu companheiro Guilherme, pelo amor, amizade, compreensão e pelos momentos de ausência.

## AGRADECIMENTOS

A meus pais, Marco Antonio e Mirtes, por todo o apoio e incentivo que sempre demonstraram aos meus estudos;

Ao Guilherme, pelo amor e compreensão;

Ao meu orientador, Professor Mário Steindel, pela orientação, confiança e exemplo;

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia, pela convivência e troca de conhecimentos;

Aos colegas do LIA e LVA, pela constante troca de informação e materiais;

Aos colegas do Laboratório de Anatomia, pelo socorro nos momentos finais;

Aos professores do curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFSC, por todo o conhecimento que passaram;

Ao professor André Báfica, que pacientemente me auxiliou na análise estatística;

Aos professores Carlos José de Carvalho-Pinto e Margherita Anna Antonia Maria Barracco, e à Iriane Eger, pelas correções e conselhos à melhoria deste trabalho;

Aos colegas formandos 2008.1, pelos desabafos e histeria compartilhados pela proximidade das defesas de TCC e da formatura;

Aos amigos do curso de Ciências Biológicas, pelos momentos de estudo e diversão dos últimos nove semestres;

Aos amigos Aurélio (Lelo), Mariane (May), Diogo (Pola), Christina (Chris) e Guilherme (Meck), pelas descontrações quase semanais e pelo apoio;

Aos amigos Ricardo, Ronan, Kauê, Bianca, Fernanda, Gabrielle, Juliana, Heloísa, Tathiane, Rodrigo e Mariáh, por terem me motivado e dividido todos os momentos importantes de minha graduação;

À amiga Daniella, presente em todas as horas (desde os desabafos desesperados no banheiro do MIP até as cervejas de sexta à tarde);

À amiga Luisa, pela convivência e apoio;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada! Sem vocês, não seria possível a realização deste trabalho.

Rebeca.

Florianópolis, 2008.

## RESUMO

O arsenal quimioterápico disponível para o tratamento da Doença de Chagas e das Leishmanioses é restrito a poucos fármacos, os quais apresentam eficácia limitada e efeitos colaterais indesejáveis. A biodiversidade de plantas brasileiras representa uma rica fonte para a busca por novos compostos com potencial antiparasitário. Neste estudo, 20 extratos, 8 frações e 2 compostos isolados da flora mato-grossense foram avaliados. As amostras foram solubilizadas em DMSO (50mg/ml) e mantidas a 4° C até o uso. Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa 575) e *L. chagasi* (cepa PP75), e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) ( $5 \times 10^6$  parasitos/ml), mantidos respectivamente em meio Schneider e LIT, foram incubados em triplicata em placas de 96 orifícios a 26° C com diferentes concentrações dos produtos naturais (1,6 a 1000 µg/ml). Após 72h de incubação, a atividade contra *T. cruzi* foi determinada pela contagem do número de parasitos vivos em câmara de Neubauer, e a atividade leishmanicida foi determinada pelo método de MTT. Anfotericina B (0,1µM) e Benzonidazol (10µg/ml), e DMSO 1% foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os produtos ativos contra epimastigotas de *T. cruzi* foram incubados com tripomastigotas sanguíneos ( $1 \times 10^6$  parasitos/ml) a 4° C, usando cristal violeta e DMSO 1% como controles positivo e negativo, e a sobrevivência dos parasitos foi determinada após 48h. A avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares foi realizada com células J774-A1 infectadas com *L. amazonensis* em placas de 96 orifícios na presença de diferentes concentrações dos produtos naturais por 48 horas. As monocamadas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa, e o número de amastigotas intracelulares foi determinado pela avaliação randômica de 200 células. A citotoxicidade das amostras ativas foi avaliada usando células J774-A1 ( $2 \times 10^4$  células/orifício) pelo método de MTT. Todos os ensaios foram realizados duas vezes, em triplicata. Dois extratos hexânicos (*Xilopia aromatica* e *Aspidosperma cuspa*) e uma fração (“Ipê Pimenta”) apresentaram atividade tripanocida contra epimastigotas ( $CI_{50} = 87,07; 66,41$  e  $100,46$  µg/ml, respectivamente), e o extrato hexânico de *A. cuspa* foi ativo contra tripomastigotas sanguíneos ( $CI_{50} = 150,62$  µg/ml). Quatro extratos hexânicos (*X. aromatica*, *Bowdichia virgiloides*, *A. cuspa* e *Acosmium dasycarpum*), duas frações de *Zanthoxylum hasslerianum* e o composto isolado Cumarina foram ativos contra promastigotas de *L. amazonensis* ( $CI_{50} = 15,52 - 120,9$  µg/ml) e *L. chagasi* ( $CI_{50} = 3,976 - 166,40$  µg/ml). Desses, apenas o extrato hexânico de *A. dasycarpum* não apresentou atividade em testes com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, sendo que os demais produtos testados apresentaram inibição acima de 40% nas concentrações de 1,6, 8 e 40 µg/ml. Nenhum dos extratos ativos foi citotóxico para células J774-A1 acima de 90 µg/ml.

Palavras chave: *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, produtos naturais, atividade antiprotozoários.

## ABSTRACT

The chemotherapy arsenal available for treatment of Chagas disease and leishmaniasis is restricted to few drugs which presented limited efficacy and show undesirable side effects. The Brazilian plant biodiversity represents a rich source of new potential antiparasitic compounds. In this study the trypanocidal and leishmanicidal activity of 20 extracts, 8 fractions and 2 isolated compounds from Mato Grosso State plants was evaluated. Samples were solubilized in DMSO (50mg/ml) and maintained at 4°C until use. Promastigotes of *Leishmania amazonensis* (575 strain) and *L. chagasi* (PP75 strain), and epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) ( $5 \times 10^6$  cells/ml), maintained respectively in Schneider's and LIT medium, were incubated in triplicate in 96-well microplates at 26°C with different concentrations of natural products (1.6 to 1,000 µg/ml). After 72h of incubation, the activity was determined by counting the number of live parasites in Neubauer chambers (*T. cruzi*) and by MTT method (*Leishmania* sp). Amphotericin B (0.1 µM) and Benzonidazol (10 µg/ml), and DMSO 1% were used as positive and negative controls, respectively. Products active against epimastigotes were incubated with blood trypomastigotes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) at 4°C, using violet cristal and DMSO 1% as positive and negative controls, and survival parasites determined after 48h. The *in vitro* evaluation of leishmanicidal activity against intracellular amastigotes was realized by using J774.A1 cultures infected with *L. amazonensis* in 96-well plates in the presence of different natural products dilutions for 48 hours. The monolayers were fixed with methanol and Giemsa stained, and intracellular amastigote numbers were determined in 200 randomly chosen cells. Citotoxicity of active extracts was evaluated using J774.A1 cells ( $2 \times 10^4$  cells/well) by the MTT method. All assays were performed two times in triplicate. Two tested hexanic extracts (*Xilopia aromatica* and *Aspidosperma cuspa*) and a fraction ("Ipê Pimenta") showed trypanocidal activity for epimastigotes ( $IC_{50} = 87.07; 66.41$  e  $100.46$  µg/ml, respectively) and hexanic extract of *A. cuspa* was active against blood trypomastigotes ( $IC_{50} = 150.62$  µg/ml). Four hexanic extracts (*X. aromatica*, *Bowdichia virgiloides*, *A. cuspa* and *Acosmium dasycarpum*), two fractions of *Zanthoxylum hasslerianum* and the isolated compound Coumarin were active against *L. amazonensis* ( $IC_{50} = 15.52 - 120.9$  µg/ml) and *L. chagasi* ( $IC_{50} = 3.976 - 166.40$  µg/ml) promastigotes. From this, only the hexanic extract of *A. dasycarpum* didn't show activity on tests with *L. amazonensis* intracellular amastigotes, and the other tested products showed inhibition up to 40% on 1.6, 8 and 40 µg/ml. The extracts, fractions and isolated compounds present low citotoxicity for J774.A1 cells up to 90 µg/ml.

Key words: *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, natural products, antiprotozoal activity.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AFT:** Anfotericina B

**BZD:** Benzonidazol

**°C:** Graus Celsius

**CC<sub>50</sub>:** Concentração citotóxica a 50%

**CI<sub>50</sub>:** Concentração inibitória 50%

**cm:** Centímetro

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CV:** Cristal violeta

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**IS:** Índice de seletividade

**LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana

**LV:** Leishmaniose visceral

**mg:** miligrama

**ml:** mililitro

**µl:** microlitro

**µg/ml:** micrograma por microlitro

**µM:** micromolar

**MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide

**nm:** nanômetro

**WHO:** World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

**PBS:** Tampão salina fosfato

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**PI:** Porcentagem de inibição

**SBF:** Soro bovino fetal inativado a 56° C

**U:** unidade

**UFMT:** Universidade Federal de Mato Grosso

**UFSC:** Universidade Federal de Santa Catarina

**MetOH:** Metanólico

**Hex:** Hexânico

**EtOH:** Etanólico

**AcOEt:** acetato de etila

**CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>:** Diclorometano

**LIT:** Liver Infusion Tryptose (SIGMA)

**RPMI:** RPMI-1640 Medium (SIGMA)

**DMEN:** Dubelcco's Modified Eagle's Medium – low glucose (SIGMA)

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

**Figura 2.** Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

**Figura 3.** Atividade dos extratos e fração da flora mato-grossense contra formas epimastigotas de cultura de *Trypanosoma cruzi*.

**Figura 4.** Atividade dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra formas promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis*.

**Figura 5.** Atividade dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra formas promastigotas de cultura de *Leishmania chagasi*.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Extratos, frações e compostos triados contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.

**Tabela 2.** Concentração inibitória de 50% para testes *in vitro* contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* e concentração citotóxica de 50% para testes com células da linhagem J774-A1.

**Tabela 3.** Concentração inibitória de 50% em experimentos contra formas promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense e concentração citotóxica de 50% para a linhagem celular J774.A1.

**Tabela 4.** Percentual de inibição dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1 Doença de Chagas .....	3
1.2 Leishmanioses .....	6
1.3 Uso de plantas medicinais do Cerrado .....	10
1.4 Justificativa .....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivos gerais .....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>14</b>
3.1 Parasitos .....	16
3.2 Bioensaios .....	17
3.2.1 Triagem de extratos, frações e compostos contra formas epimastigotas de cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i> e promastigotas de cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	17
3.2.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade tripanocida de extratos, frações e compostos contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . .....	17
3.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade tripanocida de compostos contra formas tripomastigotas sanguíneos de <i>T. cruzi</i> .. .....	18

3.2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida de compostos e extratos contra formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> .....	19
3.2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antiparasitária de compostos ativos contra formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp .....	20
3.2.6 Determinação da citotoxicidade de compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT. ....	21
3.3 Análise estatística .....	23
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Atividade de extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....	24
4.2 Atividade de extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra promastigotas de cultura de <i>Leishmania spp.</i> ....	26
4.3 Atividade de extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra amastigotas intracelular de <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	30
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, batizada assim depois da primeira descrição por Carlos Chagas, em 1909, existe apenas nos continentes americanos (TEMPONE *et al.*, 2007a). Esta doença é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e representa um grande problema de saúde pública nos países emergentes da América, afetando cerca de 18 milhões de indivíduos e causando a morte de aproximadamente 21000 pacientes por ano (WHO, 2002). No Brasil, estima-se em cerca de 5 milhões o número de pessoas infectadas por este parasito, das quais cerca de 40% apresentam a doença clínica (DIAS, 2000). A infecção pelo *T. cruzi* apresenta um caráter zoonótico, envolvendo inúmeras espécies silvestres e domésticas de mamíferos hospedeiros e de insetos transmissores da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros (DIAS e SCHOFIELD, 1999).

O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo, envolvendo três formas evolutivas (tripomastigota, epimastigota e amastigota) e várias espécies de triatomíneos e de mamíferos, silvestres e domésticos, que atuam respectivamente, como vetores e reservatórios do parasito. A transmissão natural ao hospedeiro mamífero ocorre pela penetração de formas tripomastigotas metacíclicas provenientes das fezes ou urina do triatomíneo infectado, depositadas sobre a pele do hospedeiro durante a hematofagia. Os tripomastigotas possuem a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, onde se multiplicam intracelularmente por divisão binária, sob a forma de amastigotas (BRENER, 2000). A elevada resposta imune do hospedeiro induzida pelo parasito não é capaz de extinguir a infecção e não o protege contra reinfecções por outras cepas do protozoário (PRATA, 2001; MILES, 2003).

No triatomíneo, os tripomastigotas ingeridos durante o repasto sanguíneo se diferenciam em epimastigotas, os quais se multiplicam por divisão binária no intestino do vetor, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos na ampola retal do inseto (MILES, 2003). O ciclo está demonstrado na figura 1.

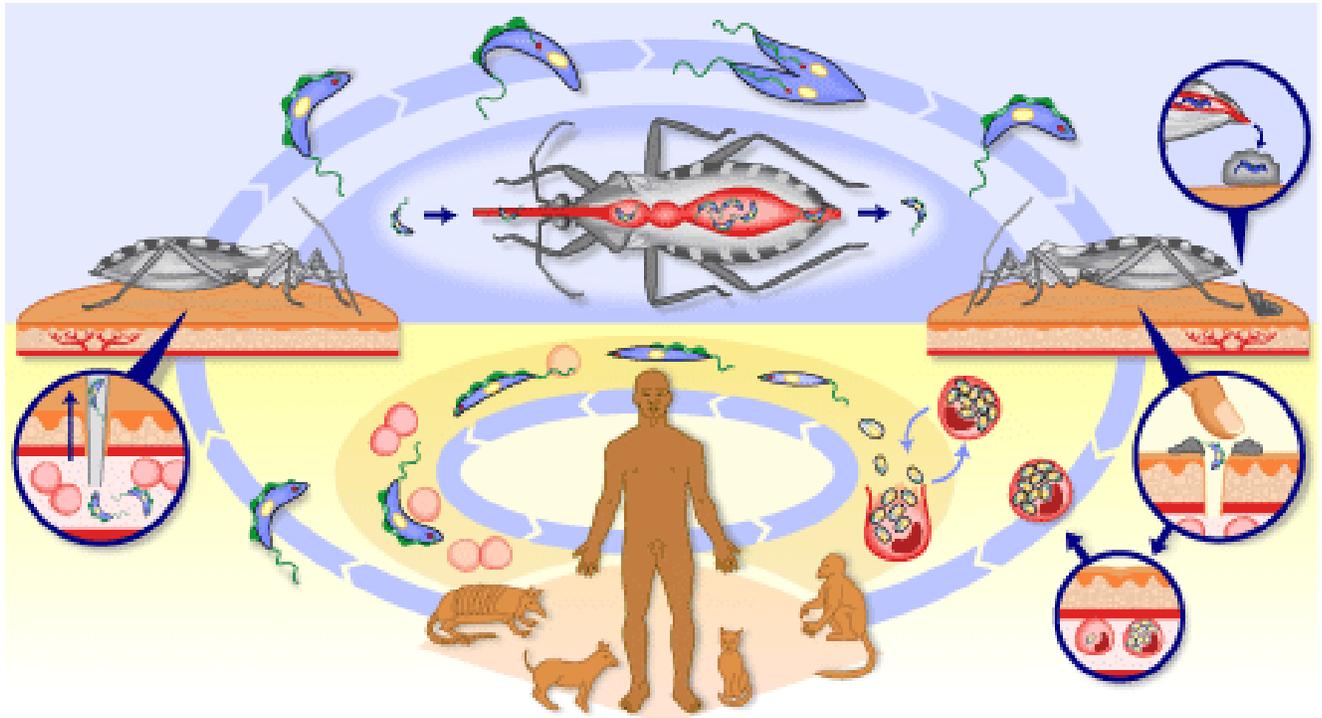


Figura 1: Ciclo biológico da *Trypanosoma cruzi* Fonte: WHO, 2004a.

A transmissão vetorial responde por cerca de 80% dos casos, e os principais vetores são os triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* sp., *Panstrongylus* sp. e *Triatoma* sp., sendo este último o mais importante transmissor nos ciclos domiciliar e peridomiciliar nas áreas de clima seco da América do Sul (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Outros mecanismos alternativos, como a transfusão sanguínea, congênita, transplante de órgãos, via oral e a acidental em laboratório são capazes de propagar a doença entre humanos (SCHMUÑIS, 2000).

Recentemente vários surtos de transmissão oral de Doença de Chagas tem sido reportados no Brasil. Em 2005, um surto de Doença de Chagas aguda foi registrada em Santa Catarina envolvendo 24 indivíduos e resultando em 3 óbitos (STEINDEL *et al.*, 2008). Isto mostra a possibilidade de ocorrência da Doença de Chagas aguda mesmo em regiões não endêmicas. Em vários países da América Latina, a transmissão vetorial tem sido reduzida de forma significativa. Por outro lado, devido as precárias condições de controle do sangue em vários países, estima-se que cerca de 20000 novos casos da doença sejam adquiridos anualmente através da via transfusional (COURA e CASTRO, 2002; LEITE *et al.*, 2006).

A Doença de Chagas apresenta um curso clínico crônico. A fase aguda inicial, que em geral dura poucas semanas, é caracterizada pela presença do parasito no sangue do paciente, podendo ser encontrados tripomastigotas de *T. cruzi* em um exame direto de microscopia em uma lâmina de sangue a fresco (TEIXEIRA *et al.*, 2007). O paciente pode ou não apresentar sintomatologia, sendo mais freqüentemente sintomática em pacientes na primeira infância, caracterizada por um quadro febril inespecífico. A fase aguda inicia-se através de manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra pela conjuntiva (sinal de Romana) ou na pele (chagoma de inoculação). Após esse período, a doença entra em uma fase crônica, que pode ou não ser determinada pela sintomatologia clínica característica da Doença de Chagas. Na fase crônica indeterminada, o paciente apresenta-se positivo para testes parasitológicos e/ou sorológicos, porém não apresenta sintomatologia clínica; já a fase crônica determinada caracteriza-se pelo comprometimento cardíaco (cardiopatia chagásica) em 20-30% dos casos, e digestivo (megaesôfago e megacólon) em aproximadamente 10% dos casos (LANA e TAFURI, 2005).

O fármaco mais freqüentemente utilizado no tratamento da Doença de Chagas no Brasil é o Benzonidazol (Roche), um derivado nitroimidazólico, com fórmula química N-

benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, desenvolvido na década de 1960. Esse composto é ativo na fase aguda da Doença de Chagas, curando cerca de 70% dos infectados, mas apresenta eficácia limitada na forma crônica da doença. Esse fármaco apresenta significativos efeitos colaterais, provavelmente como consequência de lesões oxidativas ou redutivas nos tecidos do hospedeiro. Estes efeitos colaterais, os quais incluem anorexia, vômitos, polineuropatia periférica, reações de hipersensibilidade, e, mais raramente, leucopenia e trombocitopenia, podem, em alguns casos, impedir a continuação do tratamento (KIRCHHOFF, 1999; URBINA e DOCAMPO, 2003; SANTORO *et al.*, 2007; ROCHE, 2008).

## 1.2 Leishmanioses

As Leishmanioses são um grupo de doenças polimórficas, causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Trypanosomatidae), que são transmitidos ao homem e a outros mamíferos através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia* spp. A doença tem apresentações clínicas diversas, podendo acometer a pele, as mucosas e as vísceras. No Brasil, existem sete espécies distintas do parasito sendo que, destas, seis (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. shawii*, *L. naiffi*) são responsáveis pela forma cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) – sendo essas formas compreendidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – e uma espécie (*L. chagasi*) responsável pela forma visceral (LV) (GENARO e MICHALICK, 2005; GENARO e REIS, 2005a). Considerando-se as três formas da doença, existem cerca de 12 milhões de pessoas afetadas em 88 países, principalmente na Ásia, África e América Latina, com uma incidência anual de 2-3 milhões, sendo que 500 mil são de Leishmaniose

Visceral. Estima-se que cerca de 120 milhões de pessoas encontram-se em risco de infecção (WHO, 2005).

As leishmanias apresentam duas formas evolutivas: a amastigota, que é obrigatoriamente parasita intracelular em vertebrados, e a forma promastigota que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados. A infecção do hospedeiro invertebrado por formas amastigotas ocorre durante seu repasto sanguíneo. Quando os parasitos alcançam o intestino médio do inseto, são envolvidas por uma membrana quitinosa, chamada matriz peritrófica, dentro da qual se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Após alguns dias, transformam-se em formas promastigotas delgadas e longas, que rompem a matriz peritrófica, se fixam às vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do tubo digestivo, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicas. Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo (MICHALICK, 2005).

Os promastigotas são internalizados através de endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. As leishmanias apresentam os lipofosfoglicanos, que interferem nas funções das células macrofágicas e dendríticas, e a proteína de membrana metaloprotease gp63, a qual as protege da lise mediada pelo sistema complemento e facilita sua entrada nos macrófagos (MURRAY *et al.*, 2005). Dentro do fagolisossomo, os promastigotas se transformam em amastigotas, os quais são capazes de controlar o pH do vacúolo digestivo e se multiplicarem por divisão binária no interior do fagolisossomo. Na ausência de controle parasitário da célula hospedeira, esta se rompe e os amastigotas



principalmente por *L. brasiliensis* e diferencia-se da forma cutânea por produzir lesões destrutivas de mucosas e cartilagens, através de extensão direta da lesão primária ou através da disseminação hematogênica (GENARO e REIS, 2005a). Uma terceira forma de Leishmaniose é a visceral, também conhecida como Calazar. Provocada principalmente por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, a LV é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, acompanhada de sinais biológicos de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, podendo haver linfadenopatia periférica. O emagrecimento, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para a caquexia e o óbito, se o paciente não for submetido ao tratamento específico (GENARO e REIS, 2005b).

No Brasil observa-se um crescimento alarmante dos casos de LV e LTA nos últimos 20 anos. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização. Segundo o Ministério da Saúde, cerca de 40 mil novos casos de LTA são registrados anualmente no Brasil. Além de uma cadeia epidemiológica complexa que torna difícil as ações de controle, diferentes espécies de *Leishmania* atuam como agentes etiológicos da doença. Nas Américas, a LV é causada apenas pela *L. chagasi*, enquanto que a LTA têm como agentes etiológicos mais frequentes a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* (GONTIJO e DE CARVALHO, 2003).

Apesar dos grandes progressos feitos na compreensão da bioquímica e biologia molecular do parasito, os tratamentos de primeira escolha para muitas formas de Leishmaniose ainda são injeções intramusculares diárias de antimoniais pentavalentes (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999), como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime)

e o estibogluconato de sódio (Pentostan) (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Alternativamente, o antibiótico Anfotericina B e a diamina aromática (Pentamidina) são utilizados clinicamente no tratamento das formas mucocutâneas graves ou em situações onde a LTA não responde ao tratamento com antimonialis (DEDET e PRATLONG, 2003).

### **1.3 Uso de plantas medicinais do cerrado**

Protozooses como as Leishmanioses e Doença de Chagas são importantes problemas de saúde e sócio-econômico em vários países em desenvolvimento. A quimioterapia para essas doenças é insatisfatória em termos de falta de efetividade e também dos efeitos tóxicos associados a tratamentos longos com fármacos descobertos empiricamente (OSÓRIO *et al.*, 2007).

Desde os primórdios da medicina, substâncias químicas derivadas de plantas, animais e microrganismos são usadas para o tratamento de doenças humanas. Toxinas naturais e seus derivados têm sido amplamente utilizadas nas pesquisas de fármacos e têm levado ao desenvolvimento de diversos agentes terapêuticos (TEMPONE *et al.*, 2007b)

Plantas vêm sendo utilizadas historicamente pelo homem como fonte de moléculas precursoras para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. A primeira referência escrita sobre o uso de plantas como remédios é encontrada na obra chinesa Pen Ts'ao, e remonta ao ano 2800 a.C. Relatos mostram que egípcios, hebreus e assírios cultivavam diversas ervas e traziam de suas expedições diversas outras, com as quais criavam classes de medicamentos. No Ocidente, os registros do uso de plantas medicinais são mais recentes, datando do século V a.C. No Brasil, a utilização das plantas no tratamento de doenças apresenta influências indígenas, africanas e européias (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

As plantas e seus extratos vêm sendo usados há muitos séculos como tratamentos de diversas enfermidades, desde dores de cabeça até infecções parasitárias, mas somente nos últimos 20-30 anos os cientistas começaram a determinar seriamente quais dos tradicionais medicamentos derivados de plantas são efetivos e quais são seus modos de ação (ANTHONY *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008). Estima-se que cerca de 65-80% da população mundial dependa diretamente das plantas como medicamentos (OGBADOYI *et al.*, 2007). O Brasil tem uma posição proeminente na biodiversidade mundial, uma vez que contém três extensas áreas consideradas como *hot spots* de biodiversidade: a Mata Atlântica, a Amazônia e o Cerrado (BASSO *et al.*, 2005).

A savana brasileira, conhecida como Cerrado, compreende uma flora bastante diversificada e característica (ALVES *et al.*, 2000). É o segundo bioma brasileiro em extensão, ocupando cerca de 23% do território nacional (dois milhões de Km<sup>2</sup>), com localização no planalto central, se estendendo do paralelo 5° a 20° de latitude Sul e de 45° a 60° de longitude oeste (VALENTE, 2006) e sendo considerado um complexo vegetacional de grande diversidade fitofisionômica (RIBEIRO e WALTER, 1998; NETO e MORAIS, 2003). Porém, estima-se que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado, e que apenas 1,5% do território do Cerrado está protegido por lei (NETO e MORAIS, 2003). O clima predominante no domínio do Cerrado é do tipo tropical estacional, com precipitação média anual de 1500 mm de chuva e duas estações bem definidas: uma chuvosa e outra seca (VALENTE, 2006). O relevo dominante é a Unidade Morfoescultural Planaltos Dissecados Retocados, marcado pelas formas horizontalizadas, estendendo-se por imensos planaltos ou chapadões constituídos especialmente por rochas sedimentares (VALENTE, 2006).

O Brasil é conhecido pela exuberância e diversidade de suas plantas tropicais. Muitas dessas plantas são utilizadas como medicamentos naturais sem nenhuma base

científica (BRAGA *et al.*, 2007). Nos últimos anos, muitas plantas são usadas como medicamentos naturais pelos habitantes do “cerrado” para tratar diversas doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções por fungos e bactérias, entre outras (ALVES *et al.*, 2000).

#### **1.4 Justificativa**

Como não existe disponível nenhuma vacina eficaz contra protozoários parasitos para uso em humanos, o uso dos poucos quimioterápicos existentes é uma das únicas alternativas para o tratamento dos indivíduos infectados (BRENER, 2000). Os diversos efeitos colaterais e a resistência aos fármacos existentes, bem como o aumento de novos casos, têm despertado para a urgência na busca por novos agentes terapêuticos para tratar essas doenças (MESQUITA *et al.*, 2005). Considerando a biodiversidade existente na flora brasileira e o seu potencial como fonte de moléculas bioativas a serem estudadas e exploradas, acreditamos que muitas delas podem apresentar efeitos promissores no tratamento de Doença de Chagas e das Leishmanioses.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida *in vitro* de extratos, frações e compostos da flora Mato-grossense.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a manutenção da atividade biológica dos extratos, frações e compostos isolados testados no período de 12 meses, nos quais foram realizados os experimentos de bioatividade;
2. Avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados provenientes de plantas da flora do Mato Grosso contra formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania* spp.;
3. Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de frações e compostos ativos contra formas tripomastigotas;
4. Avaliar a atividade *in vitro* de extratos, frações e compostos ativos contra formas amastigotas de *Leishmania* sp.;
5. Avaliar a citotoxicidade celular dos compostos ativos contra células J774-A1.

### 3. METODOLOGIA

Extratos, frações e compostos isolados de plantas das famílias Annonaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Leguminosae e Rutaceae da flora do Estado do Mato Grosso, foram fornecidos pelo professor Luiz Everson da Silva, do Laboratório de Pesquisa Química em Produtos Naturais – LPQPN da Universidade Federal de Mato Grosso. Os produtos naturais são apresentados na tabela 1.

A família Annonaceae compreende cerca de 120 gêneros que têm distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo, sendo a maioria dos seus representantes plantas lenhosas. A família Apocynaceae compreende cerca de 200 gêneros com mais de 2000 espécies, de hábitos variados e distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo. A família Bignoniaceae é composta por 120 gêneros de ampla distribuição tropical e hábitos variados, sendo especialmente frequentes nos trópicos americanos. A família Leguminosae é uma das maiores entre as dicotiledôneas, apresentando 600 gêneros e cerca de 13000 espécies. Subdivide-se em três subfamílias (Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinoideae), e fazem simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* (JOLY, 2002).

Os extratos, frações e compostos isolados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mg/ml, e mantidos a 4°C até o uso. Como compostos controle, foram utilizados o cristal violeta e Benzonidazol (Rochagan®) para os experimentos com *T. cruzi*, e a Anfotericina B para *Leishmania* sp.

Tabela 1. Extratos, frações e compostos triados contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.

Sigla	Família	Extrato/Composto
MT1	Annonaceae	Extrato bruto MetOH da semente de <i>Xylopiya aromatica</i>
MT2	Annonaceae	Extrato bruto Hex da semente de <i>Xylopiya aromatica</i>
MT3	Annonaceae	Extrato bruto MetOH da casca de <i>Xylopiya aromatica</i>
MT4	Annonaceae	Extrato bruto Hex da casca de <i>Xylopiya aromatica</i>
MT5	Annonaceae	Extrato bruto EtOH da semente (sólido) de <i>Annonna crassiflora</i>
MT6	Annonaceae	Extrato bruto EtOH do óleo da semente de <i>Annonna crassiflora</i>
MT7	Leguminosae	Extrato bruto MetOH das cascas da raiz de <i>Bowdichia virgiloides</i>
MT8	Leguminosae	Extrato bruto Hex das cascas da raiz de <i>Bowdichia virgiloides</i>
MT9	Leguminosae	Extrato bruto Hex das cascas da raiz de <i>B. virgiloides</i> – lavado com acetona
MT10	Leguminosae	Extrato bruto Hex das cascas da raiz de <i>B. virgiloides</i> – solúvel em acetona
MT11	Leguminosae	Extrato bruto Hex das cascas da raiz de <i>B. virgiloides</i> – insolúvel em acetona
MT12	Apocynaceae	Extrato bruto Hex de <i>Aspidosperma cuspa</i>
MT13	Apocynaceae	Extrato bruto MetOH de <i>Aspidosperma cuspa</i>
MT14	Leguminosae	Extrato hidroalcoólico de <i>Vatairea macrocarpa</i>
MT15	Bignoniaceae	Fração AcOEt do Extrato MetOH do cerne do caule do “Ipê Pimenta”*
MT16	Leguminosae	Extrato bruto Hex das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i>
MT17	Leguminosae	Extrato bruto Diclorometano das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i>
MT18	Leguminosae	Extrato bruto MetOH das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i>
MT19	Leguminosae	Extrato bruto Hex da casca do caule de <i>Acosmium dasycarpum</i>
MT20	Leguminosae	Extrato bruto MetOH da casca do caule de <i>Acosmium dasycarpum</i>
MT21	Rutaceae	Ext. Hex. raiz de <i>Spiranthera odoratissima</i>
MT22	Rutaceae	Fração Hex. <i>Zanthoxylum riedelianum</i>
MT23	Rutaceae	Fração AcOEt. <i>Z. riedelianum</i>
MT24	Rutaceae	Fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <i>Z. riedelianum</i>
MT25	Rutaceae	Fração MetOH <i>Z. riedelianum</i>
MT26	Rutaceae	Fração Acetato de Etila Folha <i>Z. riedelianum</i>
MT27	Rutaceae	Fração Hex. Folha <i>Z. riedelianum</i>
MT28	Rutaceae	Fração MetOH Folha <i>Z. riedelianum</i>
MT29	Leguminosae	Pirona <b>4-metoxi-6-P(hidroxiesteril)-<math>\alpha</math>-pirona</b> (Fr. AT casca da raiz de <i>Acosmium dasycarpum</i> )
MT30	Rutaceae	Cumarina ( <i>Spiranthera odoratissima</i> )

\* Não identificado.

### 3.1 PARASITOS

Neste estudo, foram utilizadas formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* (SILVA E NESSUNZWEIG, 1953) e promastigotas de *L. amazonensis* (cepa 575) e *L. chagasi* (cepa PH8) mantidos no Laboratório de Protozoologia da UFSC.

Epimastigotas obtidos na fase exponencial de crescimento em meio LIT foram lavados 2 vezes em PBS estéril pH 7,2 a 1500g por 10 minutos a 4°C, e o número de parasitos foi determinado em câmara de Neubauer. A seguir, os parasitos foram suspensos em meio LIT acrescido de 10% de SBF (Soro Bovino Fetal inativado a 56°C), e a concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  epimastigotas/mL, sendo mantidos a 4°C até o uso.

As formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas de camundongos infectados no pico de máxima parasitemia. Para tanto, os animais foram anestesiados com éter e o sangue coletado por punção do plexo retroorbital, com auxílio de uma pipeta Pasteur, na presença de citrato de sódio 3,8%. O número de parasitos foi determinado através da contagem de 50 campos, em lâmina e lamínula 18mm<sup>2</sup>, no aumento de 400X em microscópio de luz, em 5µl de sangue, e a concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  tripomastigotas/mL em meio LIT.

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* obtidos na fase exponencial de crescimento em meio Schneider suplementado com 5% de SBF e 2% de urina foram lavados 2 vezes em PBS estéril pH 7,2 a 1500g por 10 minutos a 4°C, e o número de parasitas foi determinado em câmara de Neubauer. A seguir, os parasitas foram suspensos em meio Schneider acrescido de 5% de SBF e 2% de urina, e a concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  promastigotas/mL, sendo mantidos a 4°C até o uso.

## **3.2 BIOENSAIOS**

### **3.2.1 Triagem de extratos, frações e compostos contra formas epimastigotas de cultura de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis*.**

Com o objetivo de triar amostras com possível atividade biológica contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp., os extratos, frações e compostos foram incubados em placas de 96 orifícios Nunc<sup>®</sup>, contendo 180 µl de uma suspensão de parasitos e 20 µl dos produtos naturais em duas concentrações (1000 e 100µg/ml), diluídas em PBS estéril, por 72h, em duplicata. Como controle negativo, os parasitos foram incubados na ausência de amostras e com DMSO 1%; como controle positivo utilizou-se Anfotericina B (0,1 µg/ml) para os ensaios com *L. amazonensis* e Benzonidazol (10 µg/ml) nos testes contra *T. cruzi*.

Os experimentos foram avaliados qualitativamente em microscópio invertido, e aqueles que demonstraram 100% de inibição nas duas concentrações foram utilizados em ensaios com diluições seqüenciais, a fim de avaliar a atividade biológica contra diferentes formas evolutivas dos parasitos e a citotoxicidade frente células de mamíferos.

### **3.2.2 Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida de extratos, frações e compostos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*.**

Para a avaliação da atividade tripanocida contra formas epimastigotas dos extratos, frações e compostos, os ensaios foram realizados em triplicatas em placas de culturas de 96 orifícios Nunc<sup>®</sup>, contendo 20µl dos produtos naturais em concentrações em ordem decrescente: 200, 40, 8 e 1,6µg/ml, diluídas em PBS estéril pH 7,2, acrescido de 180 µl da suspensão de epimastigotas. Como controle, os parasitos foram incubados na ausência de compostos, na presença de 1% de DMSO e na presença de 10µg/ml de Benzonidazol. Após

adição dos produtos naturais, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 24°C por 72 horas e, a seguir, as placas avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitas. A atividade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e posterior avaliação estatística. Os resultados foram expressos em CI<sub>50</sub>. Os ensaios foram repetidos 2 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

### **3.2.3 Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida de compostos contra formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*.**

Para avaliação dos compostos contra formas tripomastigotas sanguíneos, os ensaios foram realizados em placas de 96 orifícios Nunc<sup>®</sup>, contendo 20µl dos produtos naturais em concentrações em ordem decrescente: 200, 40, 8 e 1,6µg/ml, diluídas em PBS estéril pH 7,2, em um volume final de 200 µl contendo 1x10<sup>6</sup> tripomastigotas/ml. Como controle, os parasitos foram incubados na ausência de compostos, na presença de 250 µg/ml de cristal violeta e 1% de DMSO. As placas foram incubadas a 4°C por 48 horas, e a atividade tripanocida avaliada pela contagem do número de parasitas vivos em amostras de 5 µl de cultura em lamina e lamínula 18mm<sup>2</sup>, avaliando-se 50 campos, no aumento de 400X em microscópio de luz. Os resultados foram expressos em CI<sub>50</sub>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

Com o objetivo de verificar a esterilização do sangue tratado nos experimentos *in vitro*, grupos de 3 camundongos jovens foram inoculados por via intraperitoneal com 400 µl de sangue infectado tratado com o composto na maior concentração testada que foi

negativa na análise. A parasitemia dos animais foi acompanhada em intervalos de 2 dias, através do exame a fresco do sangue e, após 30 dias, realizada a hemocultura em todos os animais negativos. As hemoculturas foram examinadas em intervalo de 15 dias, por até 60 dias.

### **3.2.4 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de compostos e extratos contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.**

Para a avaliação da atividade leishmanicida contra forma promastigotas dos extratos, frações e compostos, os ensaios foram realizados em triplicatas em placas de culturas de 96 orifícios Nunc<sup>®</sup>, contendo 20µl dos produtos naturais em concentrações em ordem decrescente: 200, 40, 8 e 1,6µg/ml, diluídas em PBS estéril pH 7,2, acrescido de 180 µl da suspensão de promastigotas. Como controle, os parasitas foram incubados na ausência de compostos, na presença de 1% de DMSO e na presença de 0,1µg/ml de Anfotericina B. Após adição dos produtos naturais, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 24°C por 72 horas e, a seguir, as placas avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitos. Foram adicionados 50µl de uma solução de MTT a 2 mg/ml em cada orifício, e a placa foi incubada no escuro à 24° C por 4 horas. Após este período, a placa foi centrifugada a 4931 g, por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 µl de DMSO, sendo os cristais de formazan solubilizados através de agitação manual. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek, Elx800) a 540nm, e posterior avaliação estatística. Os resultados foram expressos em CI<sub>50</sub>. Os ensaios foram repetidos 2 vezes com o objetivo de

avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

### **3.2.5 Avaliação *in vitro* da atividade antiparasitária de compostos ativos contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.**

Para a avaliação da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares, foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis*, cultivados em meio Schneider, suplementado com 5% de SBF e 2% de urina. Os promastigotas foram inoculados em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> sem aeração, contendo 5ml de meio Schneider pH 7,4, suplementado com 5% de SBF e 2% de urina, na concentração de 5x10<sup>6</sup> parasitos/ml, e incubados a 26°C. A curva de crescimento dos parasitos foi acompanhada diariamente, até que os mesmos alcançassem a fase exponencial tardia, aproximadamente dois dias após o inoculo, com uma concentração de, aproximadamente, 11x10<sup>8</sup> parasitos/ml. A seguir, 2,5ml da cultura de parasitos foram centrifugados em tubo falcon de 15ml, a 6800 g por 10 min, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando os parasitos em 5ml de meio Schneider pH 5,5, suplementado com 20% de SBF e 2% de urina. A suspensão de parasitos foi incubada em frasco de cultura de 25cm<sup>2</sup>, sem aeração, por 48hs, a 34°C. A viabilidade celular dos parasitos foi avaliada pela adição do corante vital (azul de tripan 0,02%) e a morfologia das formas amastigotas observada em preparações coradas pelo Giemsa ou pela observação da morfologia da células em microscopia de interferência. O volume contendo 10<sup>7</sup> parasitos foi centrifugado a 6800 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e os parasitos ressuspensos, homogeneizando a suspensão com o auxílio de uma seringa de 1ml.

Células da linhagem J774-A1, mantidas em cultura no Laboratório de Protozoologia, foram lavadas uma vez com meio RPMI suplementado com 20% de SBF. A seguir, adicionou-se 2ml de meio RPMI suplementado com 20% de SBF e as células foram removidas do frasco de cultivo celular com auxílio de *scraper*. Sua concentração foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/ml em meio RPMI suplementado com 20% de SBF. Dois mililitros dessa suspensão foram adicionados aos parasitos previamente preparados. A suspensão de células e parasitos foi mantida a 37°C por 12 horas sob agitação branda.

Após a adição de 18 ml de RPMI suplementado com 20% de SBF e homogeneização, 180µl da suspensão foram distribuídos em placas de 96 orifícios Nunc<sup>®</sup>, a 34°C por 1 hora. A seguir foram adicionados 20 µl dos produtos naturais em concentrações decrescentes (200, 40, 8 e 1,6µg/ml), diluídas em PBS estéril pH 7,2, em triplicata, e a placa mantida a 34°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 48h. Como controle, as monocamadas foram incubadas na presença de 1% de DMSO e 0,1µg/ml de Anfotericina B e em meio de cultura. A seguir, o meio foi removido através de aspiração a vácuo, a placa foi seca, fixada com metanol e corada com Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio invertido, através da avaliação da infecção de 200 células por orifício. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

### **3.2.6 Determinação da citotoxicidade de compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT.**

A atividade mitocondrial foi avaliada através da técnica do MTT, conforme descrito por Loosdrecht *et al.* (1991) e modificada por Sieuwerts *et al.* (1995).

Para a avaliação da citotoxicidade frente a linhagens de células J774-A1, depositada no Criobanco do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, as células foram cultivada em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 5mL de meio RPMI, suplementado com 5% de SBF, mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e repicadas semanalmente. Após a remoção do meio de cultura, as monocamadas celulares foram removidas da garrafa com o auxílio de *scraper*, e transferidas para tubo falcon de 15ml. A seguir, as células foram suspensas em 1 ml de meio DMEM e a concentração ajustada para 2x10<sup>5</sup> células/ml. A viabilidade celular foi avaliada pela adição do corante vital (azul de tripan 0,02%). Cento e oitenta microlitros da suspensão celular foram distribuídos em placas de 96 orifícios Nunc<sup>®</sup>, excetuando-se a primeira coluna, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. A seguir, foram adicionados 20 µl dos produtos naturais em concentrações decrescentes (200, 40 e 1,6µg/ml), diluídas em PBS estéril pH7,2, em triplicata, e as células mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Como controle, as monocamadas foram incubadas com na presença de 1% de DMSO e 10µg/ml de Benzonidazol, 0,1µg/ml de Anfotericina B e em meio de cultura. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado e adicionado 50µl de uma solução de MTT a 1 mg/ml e a placa novamente incubada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. A seguir, o sobrenadante foi retirado, foram adicionados 100µl de DMSO, e os cristais de formazan foram solubilizados através de agitação manual. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek, Elx800) a 540nm. Os resultados foram expressos em CC<sub>50</sub>. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade dos produtos naturais e a reprodutibilidade dos resultados.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de  $CI_{50}$  (concentrações inibitória de 50%) foram estimados a partir dos valores médios de 3 experimentos por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos como média das  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de pelo menos 2 experimentos independentes, acompanhada de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett, quando apropriado. Os valores de percentual de inibição (PI) foram calculados segundo Guru *et al.* (1989) e modificado por Lakshmi *et al.* (2007), utilizando a seguinte fórmula:

$$PI = 100 - (T/C.100),$$

onde T é a média de três repetições, da soma dos amastigotas intracelulares encontrados em 200 células no tratado; C é a média de três repetições da soma dos amastigotas intracelulares encontrados em 200 células no controle de DMSO 1%.

Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados como indicativo de significância

#### 4. RESULTADOS

Dos 20 extratos, 8 frações e 2 compostos isolados testados contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp., dois extratos e uma fração foram ativos contra epimastigotas de *T. cruzi*, sendo que um desses extratos apresentou atividade parcial contra tripomastigotas do parasito. Além disso, quatro extratos, duas frações e um composto isolado foram ativos contra formas promastigotas de duas espécies de leishmania, *L. Amazonensis* e *L. Chagasi* e, desses, apenas um extrato não apresentou inibição das formas amastigotas do parasito.

Nos doze meses em que os experimentos foram realizados, as amostras foram mantidas solubilizadas em DMSO em geladeira. Os experimentos foram repetidos em intervalos de dois a três meses, sendo que a atividade biológica foram mantidas, visto que as  $CI_{50}$  e  $CC_{50}$  mostraram-se semelhantes estatisticamente nas repetições.

##### **4.1 Atividade de extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.**

Dos 20 extratos, 8 frações e 2 compostos isolados de plantas da flora Mato-grossense, três apresentaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, sendo eles o extrato bruto hexânico da casca de *Xylopia aromatica* (MT4), o extrato bruto hexânico de *Aspidosperma cuspa* (MT12) e a fração Acetato de etila do extrato bruto hexânico do cerne do caule do “Ipê Pimenta” (MT15). Os resultados, expressos em  $CI_{50}$  são mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Concentração inibitória de 50% para testes *in vitro* contra formas epimastigotas de cultura e tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* e concentração citotóxica de 50% para testes com células da linhagem J774-A1.

Composto	Epimastigotas		Tripomastigotas		Citotoxicidade
	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	SI*	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	SI*	CC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>MT4</b>	87,07 (76,63-98,94)	<b>1,24</b>	Não ativo	-	108,31 (92,09-127,38)
<b>MT12</b>	66,41 (44,35-99,44)	<b>1,39</b>	150,62 (124,42-182,34)	<b>0,61</b>	92,41 (83,58-102,16)
<b>MT15</b>	100,46 (87,20-115,73)	<b>1,31</b>	Não ativo	-	130,77 (116,01-147,42)
<b>BZD</b>	13,60	-	Não avaliado	-	Não avaliado
<b>CV</b>	Não avaliado	-	75,40	-	Não avaliado

CI<sub>50</sub> = concentração inibitória de 50%; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica de 50%.

\* Índice de Seletividade = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> (Osório et al., 2007).

Um dos extratos (MT12) ativo contra epimastigotas de *T. cruzi* foi também ativo contra tripomastigotas sanguíneos *in vitro* (CI<sub>50</sub> = 150,62 µg/ml (124,42 – 182,34µg/ml)). Embora a pesquisa direta do parasito no sangue tratado, bem como o exame a fresco do sangue dos camundongos inoculados, tenha sido negativa, a hemocultura de todos os animais positivou após o 30º dia de cultivo.

A atividade de cada um dos extratos, frações e compostos ativos contra *T. cruzi* são mostrados na Figura 3.

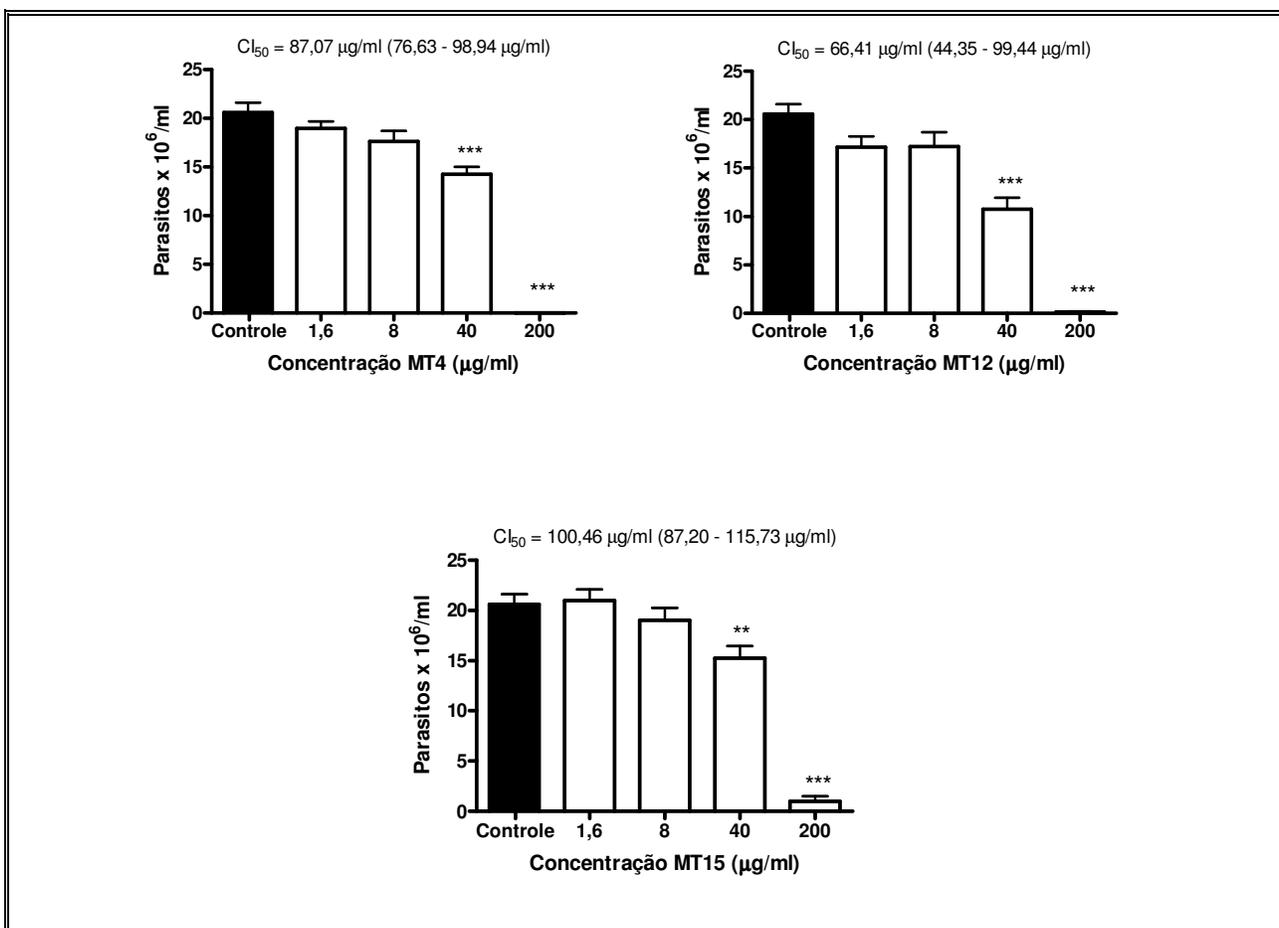


Figura 3: Atividade dos extratos e frações da flora mato-grossense contra formas epimastigotas de cultura de *Trypanosoma cruzi*. Os números entre parêntesis significam o intervalo de confiança de 95% e os asteriscos referem resultados estatisticamente significantes. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

#### 4.2 Atividade de extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra promastigotas de cultura de *Leishmania spp.*

Dos 20 extratos, 8 frações e 2 compostos isolados testados, foram ativos contra *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*: quatro extratos, sendo eles o extrato bruto hexânico de *Xylopia aromatica* (MT4), o extrato bruto hexânico das cascas da raiz de *Bowdichia virgiloides* lavado em acetona (MT9), o extrato bruto hexânico de *Aspidosperma cuspa*

(MT12), o extrato bruto hexânico da casca do caule de *Acosmium dasycarpum* (MT19); duas frações, sendo elas a fração acetato de etila de *Zanthoxylum hasselarianum* (MT23) e a fração diclorometano de *Z. hasselarium* (MT24); além de um composto isolado, a Cumarina (MT30). Os resultados expressos em  $CI_{50}$  são mostrados na tabela 3.

Os gráficos da atividade de cada um dos extratos, frações e compostos ativos contra *Leishmania* sp. são mostrados nas figuras 4 (*L. amazonensis*) e figura 5 (*L. chagasi*).

Tabela 3. Concentração inibitória de 50% em experimentos contra formas promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense e Concentração citotóxica de 50% para a linhagem celular J774.A1.

Composto	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. chagasi</i>		CC <sub>50</sub> (µg/ml)
	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	IS*	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	IS*	
<b>MT4</b>	15,77 (12,32-20,17)	<b>6,87</b>	29,10 (16,62-50,94)	<b>3,72</b>	108,31 (92,09 -127,38)
<b>MT9</b>	95,36 (81,03-112,2)	<b>1,34</b>	35,64 (27,79-45,7)	<b>3,59</b>	127,90 (113,99-143,51)
<b>MT12</b>	47,34 (35,81-62,58)	<b>1,95</b>	12,94 (11,15-15,01)	<b>7,14</b>	92,41 (83,58 -102,16)
<b>MT19</b>	120,90 (101,50-143,90)	<b>1,09</b>	137,00 (54,82-342,6)	<b>0,96</b>	131,45 (120,94-142,88)
<b>MT23</b>	24,13 (15,03-38,76)	<b>5,06</b>	43,53 (28,45-60,63)	<b>2,80</b>	122,1 (103,51-144,03)
<b>MT24</b>	24,20 (16,42-35,67)	<b>4,59</b>	166,40 (94,91-291,60)	<b>0,67</b>	111,00 (86,22-142,89)
<b>MT30</b>	15,52 (9,89-24,34)	<b>7,60</b>	3,976 (2,347-6,733)	<b>29,65</b>	117,89 (106,9-130,0)
<b>AFT</b>	0,37 (0,35-0,39)	-	0,26 (0,25-0,26)	-	Não avaliado

CI<sub>50</sub> = concentração inibitória de 50%; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica de 50%.

\* Índice de Seletividade = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> (Osório et al., 2007).

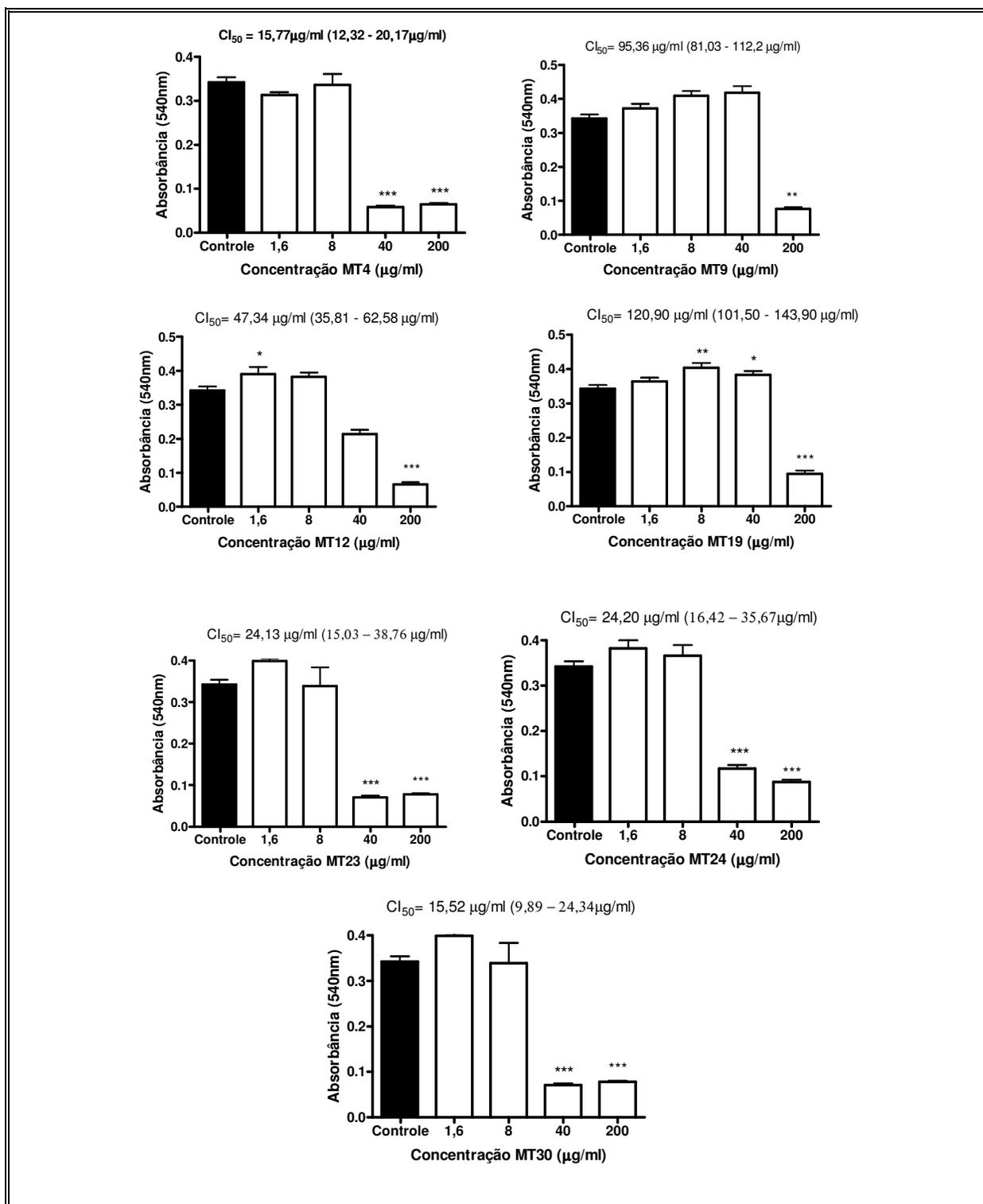


Figura 4. Atividade dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra formas promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis*. Os números entre parêntesis significam o intervalo de confiança de 95% e os asteriscos referem resultados estatisticamente significantes. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

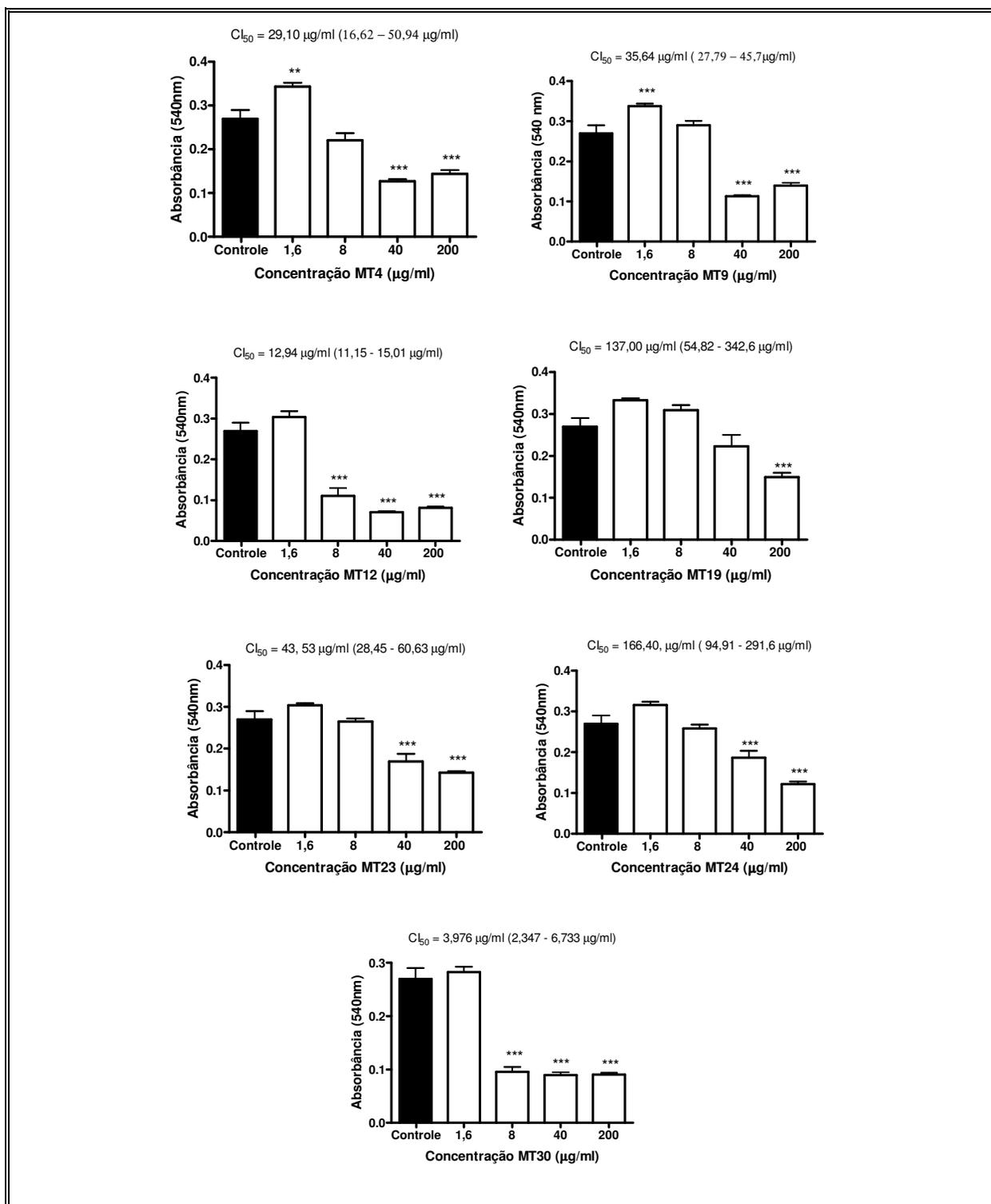


Figura 5: Atividade dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra formas promastigotas de cultura de *Leishmania chagasi*. Os números entre parêntesis significam o intervalo de confiança de 95% e os asteriscos referem resultados estatisticamente significantes. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

### 4.3 Atividade de extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*

Os extratos, frações e compostos isolados ativos contra formas promastigotas de cultura foram avaliados quanto a sua atividade frente a amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

O extrato MT19 não apresentou atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. amazonensis* em nenhuma das concentrações testadas.

A Anfotericina B apresentou 100% de inibição dos amastigotas intracelulares a 0,1 µg/ml.

Tabela 4. Percentual de inibição dos extratos, frações e compostos isolados da flora mato-grossense contra formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

Percentual de inibição (PI) <i>Leishmania amazonensis</i>				
Composto	200 µg/ml	40 µg/ml	8 µg/ml	1,6 µg/ml
<b>MT4</b>	Citotóxico	56,69%	51,03%	41,86%
<b>MT9</b>	Citotóxico	67,45%	56,94%	55,33%
<b>MT12</b>	Citotóxico	64,70%	56,95%	55,47%
<b>MT19</b>	SA	SA	SA	SA
<b>MT23</b>	Citotóxico	Citotóxico	74,52%	64,47%
<b>MT24</b>	Citotóxico	72,50%	62,19%	58,54%
<b>MT30</b>	Citotóxico	70,71%	65,74%	58,77%

SA = sem atividade. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

## 5. DISCUSSÃO

Aproximadamente 60% dos fármacos antiparasitários, antibacterianos, antivirais e antitumorais disponíveis no mercado ou ainda em fase de testes clínicos são de origem natural (SHU, 1998). Considerando as várias doenças que acometem o homem, as parasitoses e nodatamente, as protozooses e helmintoses são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade (BRENER *et al.*, 2000). Apesar dos progressos no controle vetorial de algumas parasitoses nos últimos 20 anos, doenças como malária, leishmanioses, tripanosomíases e esquistossomose continuam ameaçando mais de 2 bilhões de pessoas nos países em desenvolvimento (KAYSER, 2003). As possibilidades terapêuticas para estas enfermidades continuam ainda muito limitadas e a factibilidade de uma vacina está ainda em um horizonte distante. Desta forma, o arsenal medicamentoso atualmente disponível necessita urgentemente ser incrementado.

As plantas constituem uma importante fonte de novos fármacos e apresentam-se como uma alternativa viável para o tratamento de várias doenças no contexto da medicina moderna. Embora um considerável número de fármacos atualmente disponível para o tratamento de várias enfermidades seja derivado de produtos naturais, apenas uma pequena porcentagem das cerca de 250 mil espécies de plantas tem sido investigada com relação as suas propriedades biológicas, químicas e farmacológicas (SOERJATO, 1996). Estudos clínicos, farmacológicos e químicos de medicamentos tradicionais, derivados, predominantemente, de plantas, são a base de muitos dos medicamentos atuais. A quinolona, isolada da *Chinchona*, foi importada pelos jesuítas no século XVII para o tratamento da malária. A artemisina, composto isolado de *Artemisia annua* (um antitérmico natural na China), faz parte do arsenal contra a malária. O ingrediente ativo galantime (Reminyl), usado no tratamento da doença de Alzheimer, foi originalmente isolado das

plantas *Galanthus* spp. e *Narcissus* spp. Outro exemplo é a vinblastina, um agente anticancerígeno isolado de *Catharanthus roseus* (BASSO *et al.*, 2005).

No presente trabalho, foram avaliadas as atividades tripanocida e leishmanicida de 30 extratos, frações e compostos provenientes de plantas da flora mato-grossense, dentre os quais três apresentaram atividade contra *T. cruzi* e sete foram ativos contra *Leishmania* spp..

O composto MT4 (extrato hexânico da casca de *Xylopia aromatica*) apresentou atividade moderada contra epimastigotas *T. cruzi* ( $CI_{50} = 87,07\mu\text{g/ml}$  (76,63-98,94 $\mu\text{g/ml}$ )), e contra promastigotas de *L. amazonensis* ( $CI_{50} = 15,77\mu\text{g/ml}$  (12,32-20,17 $\mu\text{g/ml}$ )) e *L. chagasi* ( $CI_{50} = 29,10\mu\text{g/ml}$  (16,62-50,94 $\mu\text{g/ml}$ )). Em estudo com plantas da família Annonaceae da flora da Colômbia, Osório *et al.* (2007) relataram resultados semelhantes aos aqui descritos para o extrato metanólico das folhas de *X. aromatica*, além de outras três espécies da mesma família (*Annona muricata*, *Rollinia pittieri* e *R. exsucca*) cujas  $CI_{50}$  e  $CC_{50}$  foram semelhantes às de *X. aromatica*. Garavito *et al.* (2006) descrevem atividade de *X. aromatica* contra *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50} < 1\mu\text{g/ml}$ ). Estudos mostram que essa planta possui propriedades anti-sépticas e analgésicas, bactericida, fungicida e inseticida (IWU *et al.*, 2004). Na Colômbia, o chá de *X. aromatica* é utilizada no tratamento da malária (BLAIR *et al.*, 1991).

O extrato MT4 apresentou PI acima de 50% a 40  $\mu\text{g/ml}$ , em testes realizados com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Tempone *et al.* (2005), avaliando a atividade antiprotozoários de extratos de plantas brasileiras produtoras de alcalóides, observaram PI de 86,1% e 27,2% na infecção de macrófagos por amastigotas de *L. chagasi* no tratamento com 25  $\mu\text{g/ml}$  de alcalóide total de *A. crassiflora* e *A. coriaceae*, respectivamente, pertencentes a mesma família botânica que *X. aromatica*. Porém, os

pesquisadores encontraram citotoxicidade frente a células RAW 264.7 elevada para os compostos ativos.

Mesquita *et al.* (2005), estudando a atividade tripanocida e leishmanicida de plantas do cerrado brasileiro obtiveram  $CI_{50}$  entre 0,1 e 4,9  $\mu\text{g/ml}$  para *Casaria sylvestris* e *A. crassiflora*. Ainda neste estudo, foi observado uma atividade anti-parasitária moderada da raiz de *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae). Em estudo recente, avaliando a atividade anti-malária de plantas do Cerrado brasileiro, Mesquita *et al.* (2007) relataram atividade moderada para plantas da família Annonaceae (*Annona crassiflora*, *Dugeuetia furfuraceae*, *Xylopia aromatica* e *Xylopia emarginata*) e da família Apocynaceae (*Aspidosperma macrocarpon*). No presente estudo, o extrato bruto hexânico de *Aspidosperma cuspa* (MT12), pertencente à mesma família botânica, apresentou-se ativo contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, sendo que sua citotoxicidade para células J774-A1 foi intermediária ( $CC_{50} = 92,41 \mu\text{g/ml}$ ). Koga (2003) estudando a atividade tripanocida de 14 espécies da Mata Atlântica verificou que 78% delas apresentaram alguma atividade contra epimastigotas de *T. cruzi*. O extrato hexânico de *Polygala sabulosa* mostrou uma  $CI_{50}$  de 147  $\mu\text{g/ml}$  para formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. No presente estudo, o extrato bruto hexânico de *Aspidosperma cuspa* (MT12) apresentou uma  $CI_{50}=150 \mu\text{g/ml}$  contra forma tripomastigota. No entanto, o índice de seletividade do extrato foi baixo (0,61), sugerindo pouca especificidade da atividade observada. Contudo, uma vez que a amostra MT12 é um extrato bruto, ao ser fracionada poderá revelar frações e compostos isolados com atividade superior e menor citotoxicidade que o extrato bruto.

Em testes contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, o extrato bruto hexânico de *Aspidosperma cuspa* mostrou PI maior que 50% nas as concentrações de 1,6, 8 e 40µg/ml, sendo citotóxico em concentrações acima de 200 µg/ml. Estudando a atividade de uma fração enriquecida de *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae) frente a amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, Soares *et al.* (2007) encontraram PI de 88, 41 e 36% nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/ml, respectivamente. Estes resultados mostram que o extrato de *Aspidosperma cuspa* necessita ser fracionado em diferentes sistemas de solventes no sentido de identificar as frações mais ativas e identificar os compostos responsáveis pela atividade biológica.

Em estudo de atividade antiprotozoários *in vitro* de plantas medicinais de Camarões, Lenta *et al.* (2007) descreveram atividade elevada contra *Plasmodium falciparum* (CI<sub>50</sub> < 5µg/ml), *T. brucei rhodesiense* (CI<sub>50</sub> < 10µg/ml) e *Leishmania donovani* (CI<sub>50</sub> < 6µg/ml), e moderada contra *Trypanosoma cruzi* (CI<sub>50</sub> > 30µg/ml), para duas espécies do gênero *Stereospermum* (*S. acuminatissimum* e *S. zenkeri*). Em nossos estudos, a Fração AcOEt do Extrato MetOH do cerne do caule do “Ipê Pimenta” (MT15), pertencente à mesma família botânica de *Stereospermum* sp. (Bignoniaceae), apresentou reduzida atividade tripanocida contra formas epimastigotas (CI<sub>50</sub> = 100,46 µg/ml) e não se mostrou ativo contra *Leishmania* sp. A citotoxicidade frente a células de mamíferos (linhagem L-6) encontrada por Lenta *et al.* (2007) (CC<sub>50</sub> > 90 µg/ml) foi semelhante aos nossos resultados frente a células da linhagem J774-A1 (CC<sub>50</sub> (MT15) = 130, 77 µg/ml). Apesar de ter apresentado atividade reduzida em ensaios biológicos, a fração MT15 apresentou reduzida citotoxicidade, resultado compartilhado com outras plantas da mesma família botânica estudadas por outros grupos de pesquisa. Sub-frações enriquecidas e

compostos isolados desta fração podem vir a apresentar melhores resultados contra o parasito.

Nossos estudos mostraram atividade moderada de extrato bruto Hex da casca do caule de *Acosmium dasycarpum* (MT19) contra formas promastigotas de *Leishmania* sp., sendo que este composto não apresentou atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Moo-Puc *et al.* (2007) relataram atividade satisfatória contra *Giardia intestinalis* e *Entamoeba histolytica* de extratos e compostos isolados de *Senna racemosa*, pertencente à mesma família botânica que *Acosmium dasycarpum* (Fabaceae). Em estudo com plantas usadas no tratamento de diarreia, malária e protozooses pelas populações tradicionais do Gabão, Lamidi *et al.* (2005) não encontraram atividade leishmanicida para nenhuma das plantas da família Fabaceae que testaram. Esses dados corroboram os resultados neste trabalho. Apesar de plantas desta família botânica apresentarem atividade biológica nenhuma das espécies testadas foi ativa contra para *Leishmania* sp.

Duas frações derivadas de uma planta do mesmo gênero (*Z. riedelianum* – MT23 e MT24) apresentaram atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* ( $CI_{50} = 24,13\mu\text{g/ml}$  e  $43,53\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) sendo que um deles (MT23) apresentou atividade moderada contra *L. chagasi* ( $CI_{50} = 24,20\mu\text{g/ml}$ ). Além disso, observou-se a inibição de 72,5% dos amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em uma concentração de 40  $\mu\text{g/ml}$  de MT24, enquanto que MT24 inibiu 74,52% dos amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* na concentração de 8  $\mu\text{g/ml}$ , acima da qual a fração foi considerada citotóxica. O composto isolado de *Spiranthera odoratissima*, Cumarina, apresentou elevada atividade contra formas promastigotas das duas espécies de *Leishmania* testadas ( $CI_{50} = 15,52$  e  $3,976 \mu\text{g/ml}$ , para *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente),

sendo também bastante ativo contra formas amastigotas de *L. amazonensis* (PI = 70,71%, 65,74% e 58,77% em 40 µg/ml, 8 µg/ml e 1,6 µg/ml, respectivamente).

Randrianariveლოსia *et al.* (2003) observaram atividade anti *Plasmodium falciparum* moderada para alcalóides derivados de *Zanthoxylum tshihanimposa*, coletado na ilha de Madagascar e utilizado pelas populações locais em forma de infusão no tratamento de malária. Ahua *et al.* (2004), estudando a atividade de compostos isolados da raiz de *Thamnosma rhodesica* (Rutaceae), observou elevada atividade leishmanicida frente a amastigotas intracelulares de *Leishmania major* em dois compostos (gravacridonediol e rhodesiacridona, com PI = 93,8% e 98,6% a 10 µg/ml, respectivamente), não demonstrando citotoxicidade para macrófagos. DiGiorgio *et al.* (2005), analisando a atividade leishmanicida da difilina, isolada de *Haplophyllum bucharicum* Litv. (Rutaceae), uma planta endêmica do Usbequistão, encontraram atividade moderada contra promastigotas de *Leishmania* (CI<sub>50</sub> = 14.4 µM), sendo que o mesmo apresentou elevada atividade específica contra amastigotas de *Leishmania* sp., inibindo 50% da internalização dos parasitos com 0,2 µM.

A fração MT23 apresentou citotoxicidade reduzida para experimentos com células da linhagem J774-A1 (CC<sub>50</sub> = 122,1 µg/ml), porém, nos experimentos envolvendo amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, mostrou-se citotóxica a 40 µg/ml, causando destruição do tapete celular. Esse resultado pode significar um sinergismo da fração com o parasito, aumentando sua toxicidade. Novos experimentos deverão ser realizados a fim de comprovar esta hipótese.

Uma vez que a citotoxicidade dos compostos testados no presente trabalho foi baixa (CC<sub>50</sub> > 100 µg/ml) frente a testes com células da linhagem J774-A1, podemos

considerar a família Rutaceae uma potencial fonte de moléculas precursoras de novos fármacos no tratamento das Leishmanioses.

Alguns dos extratos, frações e compostos isolados ativos contra *Leishmania* spp., apesar de terem apresentado  $CI_{50}$  satisfatória, não mostraram uma curva dose-dependente (figuras 4 e 5). Em experimentos contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, alguns desses extratos, frações e compostos isolados (MT9, MT19, MT23 e MT24), em concentrações reduzidas, parecem funcionar como mitógenos, estimulando a divisão binária dos parasitos. Em outros casos (MT4, MT23, MT24 e MT30) a rápida queda da curva entre 8 e 40  $\mu\text{g/ml}$  e a manutenção da atividade constante pode mostrar uma má solubilização dos cristais do produto natural ou dos cristais de formazan, criando uma falsa curva não dose-dependente. Em experimentos contra promastigotas de *L. chagasi*, as curvas foram dose dependentes, porém, nas concentrações mais baixas (1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) os extratos, frações e compotos isolados mostrarm uma atividade menor que o controle negativo. Isso pode ser interpretado de duas formas: o funcionamento de baixas dosagens desses produtos naturais como mitógenos, ou um erro experimental relativo ao controle negativo (DMSO 1%), uma vez que, devido as diluições seqüenciais, a concentração de 1,6  $\mu\text{g/ml}$  dos produtos naturais podia conter uma concentração menor de DMSO, sendo menos tóxica que o controle.

Embora os avanços da ciência, especialmente no campo da genômica e proteômica tenham criado maiores possibilidades para o desenvolvimento racional de novos fármacos, uma revisão da literatura mostra que dos 1223 novos fármacos desenvolvidos entre os anos de 1975 e 1996, apenas cerca de 1% foram para o tratamento de doenças tropicais (WATKINS, 2003). Desta forma, a busca de novas moléculas ativas é de grande interesse e os resultados aqui apresentados mostram o potencial de plantas das famílias Annonaceae,

Apocynaceae, Bignoniaceae e Rutaceae como fontes promissoras na busca de novos agentes antiparasitários. Além disso, há necessidade de estudos complementares de fracionamento dos extratos para isolamento e identificação do(s) composto(s) responsáveis pela atividade antiparasitária das amostras estudadas.

## 6. CONCLUSÕES

- Dois extratos (MT4 e MT12) e uma fração (MT15) mostraram atividade tripanocida contra formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- O extrato MT12 apresentou atividade parcial contra formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi in vitro* (CI50 = 150,62 µg/ml);
- O extrato MT12 não apresentou atividade *in vivo*, positivando a hemocultura dos camundongos inoculados com sangue tratado com o mesmo após 30 dias;
- Quatro extratos (MT4, MT9, MT12 e MT19), duas frações (MT23 e MT24) e um composto isolado (MT30) apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*;
- Três extratos (MT4, MT9 e MT12), duas frações (MT23 e MT24) e um composto isolado (MT30) apresentaram atividade contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*;
- A atividade dos extratos e frações contra *Leishmania* foi significativamente mais elevada que para o *T. cruzi*;

- Todos os extratos, frações e composto isolado ativos contra *T. cruzi* e *Leishmania* apresentaram atividade citotóxica nas concentrações acima de 90 µg/ml para células J774.A1;
- Os produtos naturais ativos contra *T. cruzi* e *Leishmania* sp. são propensas fontes de novas moléculas precursoras de fármacos para o tratamento da Doença de Chagas e das Leishmanioses;
- Necessidade de fracionamento dos extratos e frações bioativas a fim de isolar os componentes ativos presentes nesses produtos naturais.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHUA, K.M.; IOSET, J.R.; RANSIJN, A.; MAUËL, J.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. **Phytochemistry**, n. 65, p. 963-968, 2004.
- ALVES, T.M.A; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; JÚNIOR, A.S.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n 95, v 3, p. 367-373. 2000.
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitology**, n 21, 462-468, 2005.
- BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A. G.; AZEVEDO JR., W.F.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 100, v. 6, p. 575-606, 2005.
- BLAIR, S.; CORREA, A.; MADRIGAL, B.; ZULUAGA, C.B.; FRANCO, H.D. Plantas antimaláricas, una revisión bibliográfica. 1991. **Universidad de Antiquota, Medellín**, p.214.
- BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.M.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 111, p. 396-402, 2007.
- BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO (eds). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 379-388.

- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n. 97, p. 3-24, 2002.
- DEDET, J. P.; PRATLONG, F. Leishmaniasis. In: COOK, G.C.; ZUMLA, A. (eds). **Manson's Tropical Diseases..** Londres: W.B. Saunders, 2003. p. 1339-1364.
- DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. (eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.**, Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2000. p. 48-74.
- DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. The Southern Cone initiative against Chagas disease, 1999. Cap. 42, p. 1-27, 1999. In: **Advanced Parasitology**.
- DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; AKHMEDJANOVA, V.; OLLIVIER, E.; BESSONOVA, I.; RIAD, E.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* antileishmanial activity of diphyllin isolated from *Haplophyllum bucharicum*. **Planta Medica**, n. 71, p. 366-369, 2005.
- GARAVITO, G.; RINCÓN, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G.; GIMENEZ, A.; PINZÓN, R.; DEHANO, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 107, p. 460-462, 2006.
- GENARO, O.; MICHALICK, M.S.M. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 67-83.
- GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005a. p. 47-66.
- GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005b. p. 67-83.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, L. B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, n. 36, p. 71-80, 2003.

GURU, P.Y.; AGRAWI, A.K.; SINGHA, U.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tuftsin-bearing liposomes as drug vehicles. **Federation of European Biochemical Societies**, n.1, v.2, p.204-208, 1989.

IWU, M.M.; JACKSON J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology today**, n. 10, p. 65-68, 1994.

KAYSER, O., KIDERLEN, A.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, n. 90, p. 55-62, 2003.

KIRCHHOFF, L.V.. Chagas disease (American Trypanosomiasis): a tropical disease now emerging in the United States. In: SCHELD, W.M.; CRAIG, W.A.; HUGHES, J.M. (eds.). **Emerging Infections**. Washington, DC: ASM Press, 1999. v. III, p 111-134.

KOGA, A.H. Avaliação da atividade tripanocida de compostos obtidos de plantas. Florianópolis, 2003. 65 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGb, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. *In vitro* and *In vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, n.14, p. 36-42, 2007.

LAMIDI, M.; DIGIORGIO, C.; DELMAS, F.; FAVEL, <sup>a</sup>; MVE-MBA, C.E.; RONDI, M.L.; OLLIVIER, E.; NZE-EKEKANG, L.; BALANSARD, G. *In vitro* antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 102, p. 185-190, 2005.

- LANA, M. de; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. In: NEVES, D.P. *et al. Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 85-108.
- LEITE, P.V.; OLIVEIRA, A.B.; LOMBARDI, J.A; FILHO, J.D.S.; CHIARDI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 29, v. 11, p. 2307-2309, 2006.
- LENTA, B.N.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; SOH, R.F.; TANTANGMO, F.; NGOUELA, S.; KAISER, M.; TSAMO, E.; ANTON, R.; WENIGER, B. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 111, p. 8 – 12, 2007.
- MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C; FOURNET, A.; PAULA, J.E. de; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 100, v. 7, p. 783-787. 2005.
- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E. de; ESPINDOLA, L.S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 165 – 170, 2007.
- MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. *et al. Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 41-46.
- MILES, M.A. American trypanosomiasis (Chagas disease). In: COOK, G.C.; ZUMLA, A. (eds). **Manson's Tropical Diseases**. Londres: W.B. Saunders, 2003. p. 1325-1337.
- MOO-PUC, R.E.; MENA-REJON, G.J.; QUIJANO, L.; CEDILLO-RIVERA, R. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 112, p.415-416, 2007.

- MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, n. 336, p. 1561-1577, 2005.
- NETO, G.G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, n. 17, v. 4, p. 561-584. 2003.
- OGBADOYI, E.O.; ABDULGANIY, A.O.; ADAMA, T.Z.; OKOGUN, J.I. *In vitro* trypanocidal activity of *Annona senegalensis* Pears. Leaf extract against *Trypanosoma brucei brucei*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 112, p.85-89, 2007.
- OSÓRIO, E. *e al.* Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 111, p. 630-635, 2007.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Diseases**, n. 2, v. I, p. 92-100, 2001.
- RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; RASIDIMANANA, V.T.; RABARISON, H.; CHEPLOGOI,P.K.; RATSIMBASON, M.; MULHOLLAND,D.A.; MAUCLÈRE, P. Plants traditionally prescribed to treat *tazo* (malaria) in the eastern region of Madagascar. **Malaria Journal**, 2003. <http://www.malariajournal.com/content/2/1/25>
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado.. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa. 1998. p. 87-166.
- ROCHE. Rochagan. 2008. <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/26F1D9BB-FE75-4CC4-8EFD-96CB85C374BD/603/Rochagan.pdf>

- SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, n. 116, p. 283-290, 2007.
- SCHMUÑIS, G. A. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO (eds). ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***.Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 1-15.
- SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, n. 61, p. 1053-1071, 1998.
- SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, n. 33, p. 813-823, 1995.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, São Paulo, n. 20, p. 191-208. 1953.
- SOARES, D.C.; PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A.; SARAIVA, E.M.; Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, n. 56, p. 135-139, 2007.
- SOERJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefitsharing: perspectives from field. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 51, p. 1-15, 1996.

STEINDEL, M.; PACHECO, L.K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M.H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T.C.M.; STOCO, P.H.; MURTA, S.M.F.; CARVALHO-PINTO, C.J.; GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from human, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 60, p. 25-32, 2008.

TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; KIUCHI, F. *In vitro* Leishmanicidal constituents of *Millettia pendula*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, n. 54, v. 6, p. 915 – 917, 2006.

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N., GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas disease. **Postgraduation Medicine Journal**, n. 82, p. 788-798, 2007.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE JR., H.F. de; GUALDA, N.C.A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinole alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, n.12, p. 382-390, 2005.

TEMPONE, A.G.; MELHEM, M.S.C.; PRADO, F.O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R.H.; ANTONIAZZI, M.M.; HADDAD, C.F.B.; JARED, C. Amphibian secretins for drug discovery studies: a search for a new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in Drug Design & Discovery**, n. 4, p. 67-73, 2007 b.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNADES, F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for american trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological agents in Medicinal Chemistry**, n. 5, p. 222-235, 2007a.

- TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e contexto em Enfermagem**, n 15, v 1, p. 115 –121, 2006.
- TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.E.C.; MEIRELLES, M.N.; ROSSI-BERGMAN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, n. 43, v. 5, p. 1234-1241, 1999.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, n. 19, p. 495-501, 2003.
- VALENTE, C.R. Caracterização geral e composição florística do cerrado. In: GUIMARÃES, L.D.; SILVA, M.A. da; ANACLETO, T.C. **Natureza Viva Cerrado**. Goiânia: Editora da UCG, 2006. p. 21-44.
- VIEIRA, N. C.; ESPÍNDOLA, L.S.; SANTANA, J.M.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.L.; PINHEIRO, S.M.; ARAÚJO, R.M.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n 16, p. 1676-1682, 2008.
- WATKINS, B.M. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 477-478, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas Disease. 2002. (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. 2004a. (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Life cycle of *Leishmania* sp. 2004b.  
(<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. 2005.  
(<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/leish-poster.pdf>)

NUNES, R.K. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense. Florianópolis, 2008. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.