

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Imunomodulação e ação anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis*
por *Ouratea cuspidata* (Ochnaceae).**

Renata da Silva Ribeiro

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Imunomodulação e ação anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis* por *Ouratea cuspidata* (Ochnaceae).

RENATA DA SILVA RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor
Dr. Ronald Bastos Freire

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007

579.4

R484i

T

Ribeiro, Renata da Silva, 1978-

Imunomodulação e ação anti-Leishmania (*Viannia*) *braziliensis* por
Ouratea cuspidata (Ochnaceae) / Renata da Silva Ribeiro – 2007.

56 f. : il.

Orientador: Ronald Bastos Freire.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de
Veterinária.

Bibliografia: f. 37-45.

1. *Leishmania braziliensis* - Teses. 2.
Parasitismo-Teses. 3. Relação hospedeiro-
parasito - Teses. I. Freire, Ronald Bastos,
1953- II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

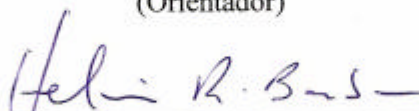
RENATA DA SILVA RIBEIRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias área de concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27 / 02 / 2007 .



Ronald Bastos Freire. Dr. UFRRJ
(Orientador)



Hécio Resende Borba. Dr. UFRRJ



Valmir Laurentino Silva. Dr. FIOCRUZ



Argemiro Sanavria. Dr. UFRRJ

À minha mãe, pelo exemplo de simplicidade, honestidade e trabalho. Pelo amor incondicional. E por sempre me incentivar na busca dos meus ideais. Muito Obrigada!

Ao meu marido Leonardo Ribeiro, pelo o amor, carinho e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar sempre na minha vida, pessoas que contribuem para o meu crescimento como ser humano.

Ao meu orientador Dr. Ronald Bastos Freire, por ter contribuído para minha formação profissional. Um exemplo de pessoa competente, profissional e muito humana. Obrigada pela confiança e pela oportunidade!

Às amigas Kelly Costa de Almeida e Deise da Silva Jacques, pela agradável convivência, pela alegria, pelas importantes sugestões e pelo carinho.

À Dr. Maria de Fátima Madeiras, da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, pelo fornecimento dos parasitos e por compartilhar suas experiências.

Ao Doutorando do Curso de Pós Graduação em Química Orgânica, Luciano Ramos Suzart sob a orientação do Professor Mário Geraldo de Carvalho, pelo fornecimento dos extratos da planta.

Aos amigos da Pós-graduação, pelos momentos alegres.

Ao meu irmão, por sempre fazer parte da minha vida.

Meu sincero obrigada a todos!!!

RESUMO

RIBEIRO, Renata da Silva. **Imunomodulação e ação anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis* por *Ouratea cuspidata* (Ochnaceae)**. 2007. 45p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Os efeitos dos extratos de *Ouratea cuspidata* (Ochnaceae) foram avaliadas a partir da exposição de células hospedeiras e de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566) às frações oriundas da sua partição hexânica (OCH), metanólica (OCMeOH) e acetato de etílica (OCAcEt). Dentre estas, a fração OCMeOH foi a única que apresentou potencial antiparasitário em doses que geraram bioproteção aos sistemas hospedeiros. Assim, procederam-se análises de ação parasiticida direta do extrato OCMeOH sobre formas promastigotas, onde, também, foram avaliados o crescimento, alterações morfológicas e funções do metabolismo mitocondriais. Do mesmo modo, foram realizadas observações semelhantes em macrófagos peritoneais de hamsters *Cricetus cricetus* (M ϕ) afim de se determinar a toxicidade relativa para o hospedeiro. Finalmente, foram realizados ensaios complementares de bioproteção e geração de radicais livres, com a finalidade de confirmar a possível aplicação terapêutica dos constituintes presentes no extrato. Em todas as etapas experimentais, foram utilizadas cinco concentrações de OCMeOH (2mg/mL; 4mg/mL; 8mg/mL; 16mg/mL e 32mg/mL), sendo que os resultados obtidos foram comparativamente avaliados em relação a sistemas de controle (L566 e M ϕ não tratados). Os (M ϕ) tratados com 16 mg/10⁶ M ϕ /mL do extrato sofreram uma diminuição significativa (92%) de sua capacidade fagocitária, mas permaneceram viáveis, em sua maioria (78%). As alterações morfológicas mostraram-se mais evidentes em 62% das células tratadas com 32mg/10⁶ M ϕ /mL, com 70% de viabilidade e 98% de inibição da fagocitose. A atividade enzimática-mitocondrial macrofágica apresentou diminuição gradativa, com a preservação de 87% das funções enzimáticas nas células tratadas com 8mg/10⁶ M ϕ /mL; 66,3% daquelas tratadas com 16mg/10⁶ M ϕ /mL e 49% das tratadas com 32mg/10⁶ M ϕ /mL. As L566 não apresentaram a perda da viabilidade após exposição de 24horas às diferentes concentrações de OCMeOH. Ao contrário, houve um aumento significativo no número de promastigotas que, a partir de seis horas de cultivo, mostraram-se sempre superiores à quantidade de parasitos não tratados. Foram detectadas alterações morfológicas em 62% das L566 tratadas com 8mg/10⁶ L566/mL; 78% daquelas tratadas com 16mg/10⁶ L566/mL e 98% das tratadas com 32mg/10⁶ L566/mL. As promastigotas tratadas apresentaram-se arredondadas, com mitose incompleta, ou apresentando dois flagelos, sugerindo que as substâncias presentes no extrato podem interferir nas topoisomerases parasitárias. A atividade mitocondrial parasitária evidenciou a ocorrência de aceleração metabólica induzida pelo tratamento com OCMeOH. A atividade enzimática-mitocondrial foi de 220% no tratamento com 8mg/10⁶ L566/mL; de 389% com 16mg/10⁶ L566/mL e 480% com 32mg/10⁶ L566/mL quando comparadas ao controle (100%). O potencial antiparasitário (Índice Terapêutico) foi considerado positivo (IT=4,0) em função das alterações morfológicas observadas nas concentrações de 32mg/10⁶ M ϕ /mL (LD62%), e 8mg/10⁶ L566/mL (ED62%). Sendo biflavonóides os constituintes presentes em maior proporção, atribuiu-se a este grupo de substâncias a ação antiparasitária e imunotóxica observadas para OCMeOH. Os bi-flavonóides presentes no extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* estão entre os inibidores seletivos de COX2, sugerindo o desenvolvimento de pesquisas que visem sua utilização tópica em animais naturalmente infectados.

Palavras-chaves: Atividade anti-parasitária, *Ouratea cuspidata*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

ABSTRACT

RIBEIRO, Renata da Silva. **Immunomodulation and action anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes by *Ouratea cuspidata* (Ochnaceae)** 2007. 45p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Ouratea cuspidata (Ochnaceae) crude extracts were added to experimental systems containing either host macrophages, or *Leishmania braziliensis* promastigotes (L566). The biological effect by the use of the hexane (OCH), methanol (OCMeH) and ethyl-acetate (OCAcEt) extracts added at different concentrations: 2mg/mL; 4mg/mL; 8mg/mL, 16mg/mL e 32mg/mL. The OCMeOH was the only fraction to which the anti parasitic potentiality was achieved at doses rates that generated bio protective effects in the host cells. The parasiticide action, due by direct exposure of promastigotes to OCMeOH, as well as the parasitic growth, and morphological alterations intermediary metabolism alterations (mitochondrial activity) were concomitantly measured. Biological macrophagic functions were also evaluated using *Cricetus cricetus* peritoneal macrophages as a model (M ϕ). Bio-protective assays were carried out in order to determine the free radical generation by the extract constituents. The results were compared with non treated L566 and M ϕ . 78% of the 16 mg/10⁶ M ϕ /mL treated M ϕ were viable but a significant decrease of their phagocytosis capability (92%) was detected. Such alterations were evident in 62% of the cells treated with 32mg/10⁶ M ϕ /mL. At this concentration cells were 70% viable and presented 98% phagocytosis suppression. The macrophages enzymatic-mitochondrial activity was gradually diminished, with 87% activity at exposures to 8mg/10⁶ M ϕ /mL; 66,3% at exposures to 16mg/10⁶ M ϕ /mL, and 49% at exposures to 32mg/10⁶ M ϕ /mL, respectively. The anti parasitic effects were not associated to the promastigotes lack of viability. Instead, a significant rising on the L566 cells counting was detected when compared to control non treated parasites, from the first 6 hours treatment until 24 hours exposure. Morphological changes were detected in 62% of the 8mg/10⁶ L566/mL parasite treated cells; 78% after 16mg/10⁶ L566/mL treatment, and 98% of the cells presented morphological changes after 32mg/10⁶ L566/mL treatment. Cells were either round-shaped, showing incomplete mitosis, or presenting double flagella, suggesting that the present extract containing substances that might interfere in the parasitic topoisomerase function. The parasitary mitochondrial activity evidenced the occurrence of a metabolic acceleration due by the OCMeOH treatment. The mitochondrial enzymatic activity was of 220% at exposures to 8mg/10⁶ L566/mL; 389% at exposures to 16mg/10⁶ L566/mL and of 480% at exposures to 32mg/10⁶ L566/mL, respectively, when compared to the non treated parasites (100%). The anti parasitic potential (Therapeutic Index) was considered to be positive (acceptable) (TI=4,0) when estimated in function of the morphological changes observed at the extract concentration of 32mg/10⁶ M ϕ /mL (LD62%), and at 8mg/10⁶ L566/mL (ED62%), respectively. Since bi-flavonoids are the main constituents present in the OCMeOH, results were suggestive the anti parasitic effect was due to this group of secondary metabolites. As such biologically active molecules are known COX2 selective inhibitors, its internal use should be avoided. Otherwise, bi-flavonoids are good candidate substances to be applied as topical medicine to treat the American Tegumentar Leishmaniasis.

Key words: Anti-parasitic activity, *Ouratea cuspidata*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

1. Fases do ciclo biológico da Leishmaniose Tegumentar Americana, mostrando as formas infectantes (1), oriundas da saliva do hospedeiro invertebrado (Flebótomo), que são transmitidas para diferentes animais e para o homem, originando formas amastigotas (2), intracelulares e intrateciduals, que determinam reações imunitárias com lesões cutâneas definidas (A,B,C e D). 5
2. Esquema do curso da infecção por *Leishmania* sp. Ativação de linfócitos Th₁ gera resposta protetora com ativação dos macrófagos. Ativação de Th₂ gera uma infecção agressiva. 7
3. *Ouratea cuspidata* depositada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 10
4. Curva padrão de malonildialdeído (MDA) gerada através da indução de radicais livres, medidos espectrofotometricamente a 532nm frente a um padrão de malonildialdeído adquirido comercialmente. 17
5. Ensaio de redução de radicais livres com extratos de *Ouratea cuspidata*. Concentrações diferentes do extrato metanólico (barras negras), do extrato hexânico (barras cinzas) e do extrato acetato de etila (barras listradas) foram adicionadas a sistema biológico gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os tubos foram lidos a 540 nm e a concentração de TBARS determinada contra uma curva padrão malonildialdeído (barra branca) em nnoMoles por mL. 18
6. Percentual de endocitose de partículas inertes (Zymozan) em macrófagos peritoneais de hamsters (*Cricetus cricetus*) tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) durante duas horas a 37°C, 5% CO₂, em comparação ao controle constituído por células não tratadas. 19
7. Viabilidade (A) e alterações morfológicas (B) de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (L566) e de macrófagos peritoneais (Mφ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata*. 20
8. Fotomicrografia de promastigotas de *L. braziliensis* (A), e a correspondente representação gráfica (B), em ensaio de viabilidade celular pela exclusão do Azul de Trypan. As células apresentaram-se arredondadas, evidenciando o pleiomorfismo induzido pelo tratamento por 4 horas com 8mg/mL de extrato metanólico de *O. cuspidata* para cada 10⁶ promastigotas. Microscopia convencional: aumento de 1000X. As células do controle (C) sem alterações morfológicas. Microscopia convencional: aumento de 400X. A notação F na representação gráfica corresponde ao flagelo parasitário 21

9. Macrófagos corados pela Hematoxilina-Eosina.. As células apresentaram-se com alterações morfológicas compatíveis com processos apoptóticos induzido pelo tratamento por 24 horas com 32mg/mL de extrato metanólico de *O. cuspidata* para cada 10^6 macrófagos (A). Células controle sem alterações morfológicas (B). Microscopia convencional: aumento de 1000X. 22
10. Medidas de Absorbância da atividade enzimática mitocondrial em promastigotas de *Leishmania(Viannia) braziliensis* (L566) (A) e de macrófagos peritoneais ($M\phi$) de hamsters (*Cricetus cricetus*) (B), através da dosagem de cristais de formazanas, geradas pelo desdobramento fisiológico do brometo de metiltetrazólico (MTT), após exposição por 24 horas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). 23
11. Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566+OCMeOH) em meio axênico bifásico (NNN) adicionado de 16 mg/mL de extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH), em relação ao sistema controle (L566) constituído de promastigotas não expostas ao extrato. 24
12. Percentual de bioproteção contra a geração de radicais livres por diferentes concentrações da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). Os resultados representam a média de quatro repetições de ensaios realizados ‘*in vitro*’ onde as diferentes concentrações do extrato vegetal foram adicionadas sobre sistema gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). 25
13. Curva de regressão linear evidenciando a hormese bioprotetora obtida pela adição da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) sobre sistema biológico sujeito à indução de radicais livres reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). 26
14. Fórmula estrutural de alguns dos constituintes mais frequentemente identificados em plantas do Gênero *Ouratea*: 3A – Friedelina, 3B- Antranorina e 3C - Amentoflavona. Os grupamentos químicos reacionais estão destacados em vermelho. 33

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Leishmaniose	2
2.1.1. Aspectos gerais	2
2.1.2. Morfologia	3
2.1.3. Ciclo biológico	3
2.1.4. Vetores: os flebotomíneos	5
2.1.5. Resposta imune no hospedeiro vertebrado	6
2.1.6. Distribuição da doença	7
2.2. Classificação Taxonômica	8
2.3. Uso de Plantas Medicinais	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Parasitas	11
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	11
3.3. Cultivo de Macrófagos Peritoneais Hamsters Saudáveis	11
3.4. Ensaio de Bioproteção Contra a Geração de Radicais Livres	12
3.5. Curva de Crescimento	12
3.6. Avaliação da Viabilidade Celular	12
3.7. Análise da Atividade Mitocondrial	13
3.8. Índice Terapêutico	13
3.9. Avaliação da Capacidade de Fagocitose dos Macrófagos	14
3.10. Seleção da Espécie Vegetal	14
3.11. Obtenção do Material Vegetal	15
3.12. Obtenção e Preparo dos Extratos Vegetais	15
3.13. Análise Estatísticas dos Resultados	15
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

As fontes naturais de substâncias medicinais contêm numerosos metabólitos secundários, possuidores de estrutura diversificada, cuja ação biológica nem sempre é conhecida. Estima-se que cerca de 160.000 substâncias naturais foram descritas até o momento. Apesar da realização de um número considerável de pesquisas para a identificação de novos compostos químicos de origem natural, persistem diversas incógnitas no plano farmacológico, relacionadas com o potencial medicinal de plantas brasileiras, cuja diversidade e evolução atingem grandes proporções e carecem de serem preservadas e estudadas.

Considerando que menos de 10% das centenas de milhares de espécies vegetais e somente 1% das espécies marinhas vivas já foram estudadas para precisar sua composição química, podemos pensar de forma plausível que ainda existe uma enorme mina de diversidade molecular a ser explorada. Tendo-se em conta de que os medicamentos modernos não estão disponíveis ou são caros demais para a grande maioria das pessoas com um baixo nível de vida, e que a maioria dos produtos ativos contra os agentes infecciosos são produtos naturais ou elaborados a partir de estruturas derivadas de substâncias naturais, a pesquisa de espécies vegetais com potencial medicinal é uma alternativa válida que tem merecido a atenção de grandes instituições de fomento e de pesquisas em todo o mundo.

A leishmaniose é considerada um dos mais sérios problemas de saúde pública no Brasil e no resto da América Latina. Atualmente, pode-se considerar que as duas medidas de controle que têm maior impacto sobre a morbidez e a mortalidade da leishmaniose são o diagnóstico precoce e a quimioterapia.

O principal tratamento contra a leishmaniose até hoje são as injeções intramusculares cotidianas de antimônios pentavalentes estibogluconato de sódio e meglumina que representam a primeira linha de drogas para o tratamento da leishmaniose cutânea e visceral, porém apresentam variável eficácia e muitos efeitos colaterais (SABROZA *et al.*, 1992) além de requererem administração parenteral, altas doses e um longo tratamento (BERMAN, 1997). Nos casos mais severos de lesões mucosas, refratárias ao tratamento precedente, utiliza-se anfotericina B e as pentamidinas, as quais sejam utilizadas clinicamente, apresentam eficácia limitada e são muito tóxicos (SABROZA *et al.*, 1992; MSB, 2000). Além disso, existe um número crescente de pacientes que não respondem mais às drogas devido a deficiências imunitárias (HIV) ou à aparição de novas cepas de parasitas resistentes às drogas. Portanto, é uma necessidade urgente à descoberta de novos compostos de menor toxicidade e de custo reduzido em relação aos medicamentos atualmente utilizados. Existem hoje poucos compostos antileishmaniose obtidos de plantas e nenhum está atualmente em fase de desenvolvimento. É preciso, então, aumentar o número de princípios ativos “candidatos” que poderão entrar na fase do desenvolvimento farmacêutico e serem úteis no tratamento e no controle dessa parasitose.

No sentido de descobrir possíveis substâncias para o controle e tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana, a presente dissertação teve com objetivos:

- Avaliar o potencial anti-parasitário em formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* do extrato de *Ouratea cuspidata*.
- Avaliar a ação anti-inflamatória do extrato de *Ouratea cuspidata* sobre o processo fagocítico de macrófagos peritoneais de hamsters adultos (*Cricetus cricetus*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

2.1.1 Aspectos gerais

As leishmanioses representam um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross 1903., presente em praticamente todos os continentes, com exceção da Oceania (GREVELINK & LERNER, 1996). A prevalência mundial das leishmanioses está estimada em 12 milhões de casos e a incidência de 400.000 a 600.000 casos por ano para forma visceral e 1 a 1,5 milhões de casos para forma cutânea (PEARSON & SOUZA, 1996; AZULAY & AZULAY, 1997; OMS, 2003). Atualmente as doenças são prevalentes em quatro continentes sendo consideradas endêmicas em 88 países onde 72 dos quais estão localizados em países em desenvolvimento. Cerca de 90% de todos os casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão. Noventa por cento dos casos de leishmaniose cutânea-mucosa ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS, 2003).

As formas das doenças estão relacionadas à espécie do parasito e diferem em distribuição geográfica, hospedeiro e vetores envolvidos (MARZOCHI & MARSDEN, 1991; ASHFORD *et al.*, 1992).

Cada forma apresenta um perfil epidemiológico distinto, as manifestações clínicas da leishmaniose variam desde lesões cutâneas benignas, passando por formas mucocutâneas e chegando até as formas viscerais, quase sempre fatais (PESSOA & BARRETO, 1994; BERMAN, 1997). Tais agravos causam considerável morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais, sendo também consideradas infecções em outras partes do mundo devido a sua associação com imunodeficiências, como a AIDS, por exemplo (KARP *et al.*, 1996). O aumento na incidência das leishmanioses está associado com o desenvolvimento urbano, devastação das florestas, mudanças ambientais e o aumento da migração para áreas endêmicas da doença (ASFORD, 2000; PATZ *et al.*, 2000).

Nas Américas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). O ser humano adquiriu a infecção ao entrar em contato com áreas florestais. No Brasil a distribuição da LTA se dá em todo território nacional, onde atualmente todos os Estados federativos têm registro da enfermidade (MSB, 2000).

A LTA é uma doença que se tem relatos muito antigos na literatura desde do século I d.C., na Ásia Central (LAINSON, 1997; CAMARGO & BARCINSKI, 2003). As lesões encontradas nos doentes eram referidas de acordo com a região que ocorriam, como ferida de Balkh, nome de uma cidade no norte do Afeganistão, botão de Aleppo, na Síria, e botão de Bagdá, no Iraque. Esta doença era conhecida pelos viajantes como botão-do-oriental (NEVES, 2003).

Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C. que apresentam mutilações de lábios e narizes, feitas pelos índios do Peru com característica de leishmaniose cutânea-mucosa (LAINSON & SHAW, 1988).

As primeiras descrições clínicas de leishmaniose datam do século XVI e foram feitas por Olivedo, 1535, e por Pizarro, em 1571, que se referiam a uma doença que destruía o nariz e as cavidades bucais dos índios na encosta da Cordilheira dos Andes (NEVES, 2003).

No Brasil, a primeira referência de LTA foi encontrada em documentos da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “ Antiquidad de la Syphilis en el Peru, onde se relata a viagem do Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (PARAGUASSU-CHAVES, 2001).

A primeira observação dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* foi feita por Cunningham em 1885 na Índia, em casos de leishmaniose visceral. No Brasil, em 1855 Cerqueira observou lesões na pele as quais identificou clinicamente como botão de Biskra. Em 1895, na Itália, Breda descreveu a moléstia em italianos provenientes de São Paulo (PESSOA, 1982). Em 1903 Ross criou o gênero *Leishmania*, no mesmo ano, Wright descobre o agente etiológico do botão-do-oriental, incluindo-o no mesmo gênero com o nome de *Leshmania tropica* Wright 1903 (NEVES, 2003).

A natureza “leishmaniótica” das lesões cutâneas no Brasil foi confirmada pela primeira vez em 1909 por Lindenberg que encontrou formas de *Leishmania* idênticas a *Leishmania tropica* da leishmaniose do velho mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo (PESSOA, 1982). Gaspar Vianna, em 1911, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o nomeou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcera de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (SILVEIRA *et al.*, 1997). Em 1912, Gaspar Vianna introduziu o tártaro emético como tratamento inédito das leishmanioses. Esta droga foi utilizada durante muito tempo como o único agente terapêutico das LTA (NEVES, 2003).

Todos os casos de LTA no Brasil até a década de setenta eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aumento dos estudos e aprimoramento das técnicas de diagnóstico, outras espécies foram descritas, sendo registrada atualmente seis espécies causadoras de LTA, cinco do subgênero *Viannia* e um do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lansoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) shawi*, *L.(L.) amazonensis*. A forma visceral é causada por uma única espécie, do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 (LAINSON & SHAW, 1987; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI *et al.*, 1994; LAINSON, 1997; SILVEIRA *et al.*, 1997; MSB, 2000).

2.1.2 Morfologia

As formas amastigotas apresentam-se tipicamente ovóides ou esféricas, que se encontram no sistema linfomonocitário, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos do hospedeiro vertebrado (LAINSON & SHAW, 1992; WOLDAY *et al.*, 1997). Apresentam membrana citoplasmática, citoplasma onde se encontram vacúolos, um único núcleo que se apresenta esférico ou ovóide, e o cinetoplasto em forma de um bastão pequeno, situado na maioria das vezes próximo do núcleo, não apresenta flagelo livre, mas apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, uma pequena invaginação na superfície do parasito. Tamanho varia de acordo com a espécie, medindo entre 1,5-3,0 X 3,0-6,5µm (NEVES, 2003)

As formas promastigotas são formas alongadas no qual na região anterior emerge um flagelo livre. No citoplasma se observa granulações azurófilas e pequenos vacúolos. O núcleo é parecido com o da forma amastigota e situa-se no centro da célula, o cinetoplasto geralmente é ovóide e situa-se entre a região anterior e o núcleo. O tamanho da forma promastigota é variável mesmo dentro da mesma espécie, medindo cerca de 16,0-40,0µm de comprimento e 1,5-3,0µ de largura, incluindo o flagelo que freqüentemente maior que a célula (NEVES, 2003).

2.1.3 Ciclo biológico

As Leishmanias são um grupo de protozoário digenético que tem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos: roedores, edentadas (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo o homem. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (REY, 1991; MARZOCHI, 1992).

As *Leishmanias* apresentam-se sob a forma amastigota em seus hospedeiros vertebrados e a forma promastigota se encontrada no hospedeiro invertebrado.

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre no momento do repasto sanguíneo em indivíduos ou animais infectados, juntamente com o sangue e ou a linfa intersticial com as formas amastigotas (PIMENTA *et al.*, 1992). Essas formas sofrem uma divisão binária e se transformam rapidamente em promastigotas MARZOCHI (1992) que também por processos sucessivos de divisão se multiplicam ainda no sangue ingerido, que é envolto por uma membrana peritrófica secretadas pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue entre o terceiro e quarto dia a membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas ficam livres (NEVES, 2003).

As promastigotas continuam se reproduzindo por divisão binária, as espécies pertencente ao subgênero *Leishmania* se desenvolvem de forma exclusiva na porção média e anterior do intestino e as do subgênero *Viannia* se desenvolvem nas partes anterior e média, como também na região do piloro dos flebotomíneos (LAINSON & SHAW, 1979). Nestes locais ocorre a transformação das promastigotas em paramastigotas que permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal através dos hemidesmossomas. Novamente ocorre transformação em promastigotas que migram através do estômago em direção a faringe do inseto. As promastigotas que migram para parte anterior do tubo se transforma em formas metacíclicas, de fase estacionária e altamente infectiva para os macrófagos. A principal transformação bioquímica observada ocorre com a variação do tamanho das porções glicídicas de molécula de lipofosfoliglicano (LPG) ancoradas na superfície da membrana das promastigotas que possui participação fundamental no processo infeccioso (SACKS, 1992; WILSON, 1993; NEVES, 2003). Durante o processo de alimentação do vetor as formas promastigotas são introduzidas no local da picada (Figura 1).

Dentro de 4 a 8 horas, estes flagelados são interiorizados pelos macrófagos teciduais. Rapidamente as formas promastigotas se transformam em amastigotas que são encontradas 24h após a fagocitose. Dentro do vacúolo fagocitário dos macrófagos, as amastigotas estão adaptadas ao novo meio fisiológico e resistem à ação destruidora dos lisossomos, multiplicando por divisão binária até ocupar todo o citoplasma (WILSON, 1993; NEVES, 2003).

Esgotando sua resistência o macrófago se rompe e libera as amastigotas no tecido, sendo novamente fagocitada e iniciando no local uma resposta inflamatória (NEVES, 2003).

A saliva do flebotomíneo possui neuropeptídeos vasodilatadores que atuam facilitando a alimentação do inseto e ao mesmo tempo imunossuprimindo a resposta do hospedeiro vertebrado exercendo um importante papel no sucesso da infectividade das promastigotas metacíclicas (NEVES, 2003).

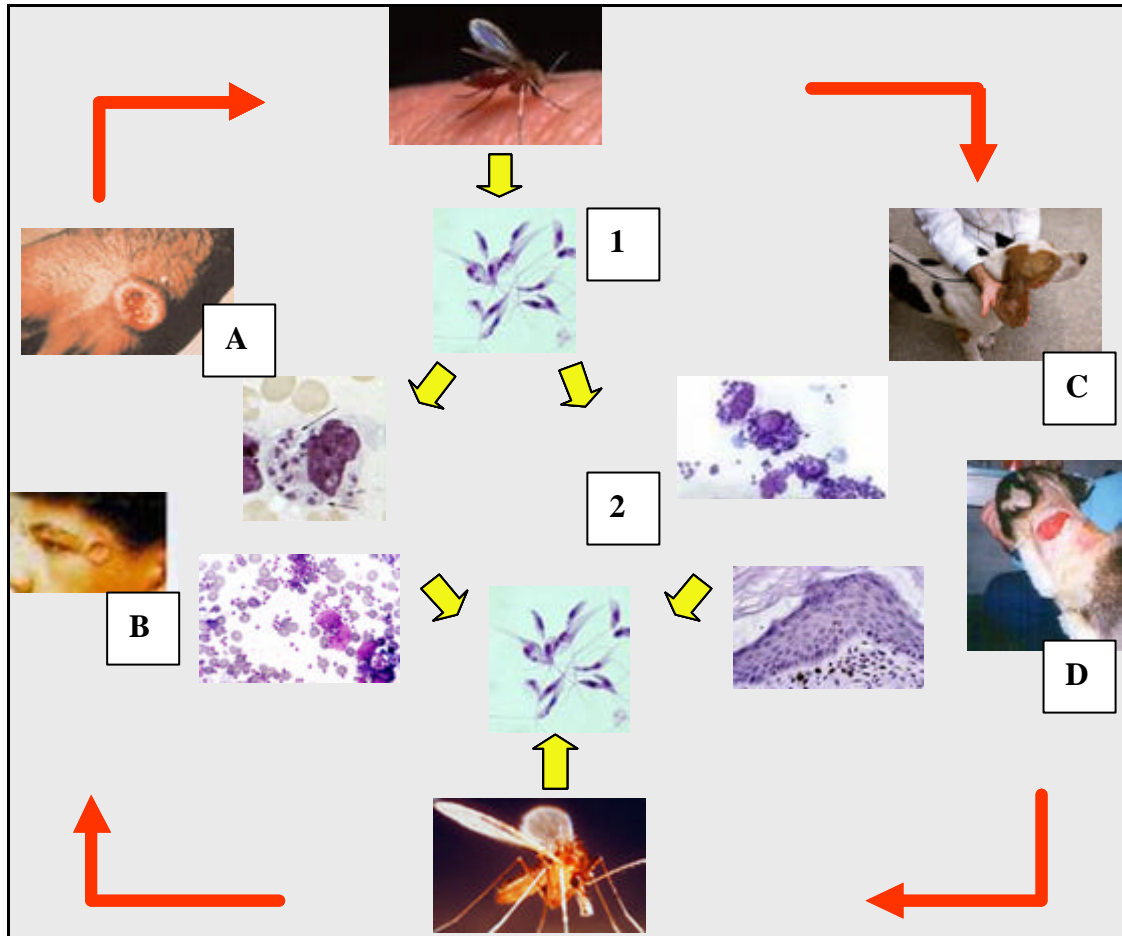


Figura 1. Fases do ciclo biológico da Leishmaniose Tegumentar Americana, mostrando as formas infectantes (1), oriundas da saliva do hospedeiro invertebrado (Flebótomo), que são transmitidas para diferentes animais e para o homem, originando formas amastigotas (2), intracelulares e intratecuiduais, que determinam reações imunitárias com lesões cutâneas definidas (A,B,C e D).

2.1.4 Vetores: os flebotomíneos

Os flebotomíneos (Ordem Díptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominaea) constituem um grupo de insetos hematófagos, responsáveis pela transmissão das leishmanioses. Geralmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, tendo pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Têm como característica vôo saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros. Geralmente é de cor parda, sendo que apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Apresentam vários nomes populares com: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado (REBÊLO, 1999).

O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas e distribuídas desde do sul do Canadá até o norte da Argentina. Destas pelo menos 200 ocorrem na bacia Amazônica (REBÊLO, 1999; GIL *et al.*, 2003)

Muito pouco se sabe dos seus criadouros, podendo encontrar as formas imaturas em detritos de fendas de rocha, cavernas raízes do solo e de folhas mortas e úmidas, ou seja, em

solo úmido e não molhado, e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (REBÊLO, 1999; NEVES, 2003).

2.1.5 Resposta imune no hospedeiro vertebrado

A resposta inflamatória é principal resposta a LTA, ocorrendo tanto na instalação do parasitismo, quanto durante o desenvolvimento de lesões e sintomas do parasitismo. Nas fases iniciais da doença, quando se dá a inoculação de promastigotas infectantes, a resposta inflamatória local estabelece a produção de elevadas concentrações de Interleucina 12 (IL-12) que atraem e estimulam células “Natural Killer” (NK). As células endoteliais e os fagócitos infectados, embora incapazes de eliminar eficazmente os parasitos fagocitados, expressam determinantes do complexo de histocompatibilidade principal da classe I (MHC-I) modificados.

As células NK, possuidoras de receptores de reconhecimento do tipo $CD4^+8^+$, reconhecem as modificações e lançam suas imunotoxinas (perforinas) para a destruição das células infectadas. Ocorre, a liberação de interferon gama ($INF\gamma$) que atua estimulando a fagocitose, realimentando assim o sítio de introdução do parasito com infiltrados de monócitos circulantes. Uma vez que a resposta adaptativa, tanto humoral como celular, depende de um processamento eficaz do agente parasitário e da distribuição bem sucedida do parasito nos órgãos linfóides periféricos, esta irá variar de acordo com o hospedeiro. Via de regra, a resposta humoral na leishmaniose tegumentar americana é muito fraca (UCHOA *et al.*, 2001). Em infecções humanas foi descrito que a resposta imune é predominantemente celular. A resposta mediada por linfócitos T colaboradores (Th) com receptores $CD4^+8^+$ ($CD8^+$), do tipo 1, promove a produção de IL-12 e $INF\gamma$ (Figura 2), o que determina resistência a infecção por *Leishmania* e a baixa resposta humoral, observada em pacientes em cura ou recém infectados (AJDARY *et al.*, 2000; UCHOA *et al.*, 2001). A resposta do tipo 2 prevalece em infecções severas e parece estar associada ao aumento de IL4 e à estimulação e diferenciação de linfócitos B, caracterizando-se pelo aumento na produção de anticorpos antiparasitários e o aparecimento de reações inflamatórias decorrentes de reações de hipersensibilidade dos tipos I, II e III nos órgãos e tecidos infectados. A resposta humoral na infecção tegumentar, caracteriza-se pela baixa quantidade de anticorpos séricos. BRAY (1985) sugeriu existirem grandes quantidades de anticorpos específicos que são produzidos somente na leishmaniose visceral, em lesões múltiplas na leishmaniose cutânea (metástases) em fases mais tardias da infecção e nas lesões cutâneas simples, quando o parasito atinge os órgãos linfóides periféricos, tais como os linfonodos regionais, onde se estabelece a fagocitose, o processamento parcial por células apresentadoras de antígenos, ou através da simples captura e apresentação de partes do antígeno pelas células dendríticas, com estimulação de linfócitos Th $CD4^+$.

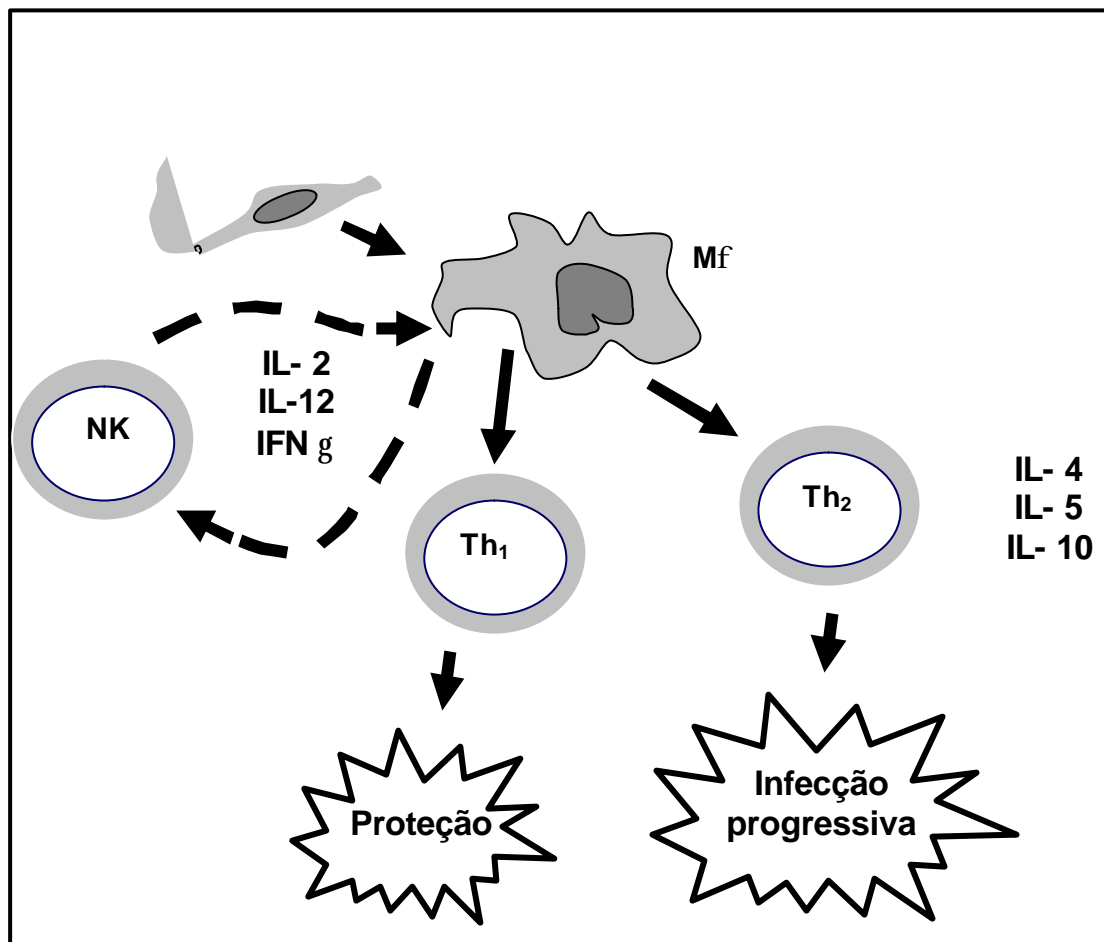


Figura 2. Esquema do curso de infecção por *Leishmania* sp. Ativação de linfócitos Th₁ gera resposta protetora com ativação dos macrófagos. Ativação de Th₂ gera uma infecção progressiva.

2.1.6 Distribuição da doença

A LTA ocorre nas Américas desde do Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (MONTENEGRO, 1926). O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile. A incidência de LTA no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os estados. Surto epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente na região Amazônica, relacionados com processos predatórios e de colonização (MARZOCHI, 1992).

A incidência da LTA no Brasil foi estimada pela Organização Mundial de Saúde entre 1980 e 1990, um total de 154.103 casos (WHO, 1990). No período de 1985 a 1999 outra estimativa apontava para 388.155 casos nativos de LTA (MSB, 2000). Fazendo uma comparação entre as duas estimativas houve um aumento de 13.654 casos /anos para 30.550 casos/ano (MSB, 2000). Deve-se salientar que a ocorrência do perfil periurbano de transmissão, está associado com a falta de saneamento básico, situação econômica precária, o deslocamento da população para periferia das cidades, o convívio com animais que servem de novos reservatórios da doença (MARZOCHI, 1992).

2.2 Classificação Taxonômica

A posição sistemática da espécie *Leishmania braziliensis* proposta por Levine *et al.*(1980) é a seguinte:

Reino: Protista Haeckel 1886

Subreino: Protozoa Goldfuss 1817

Filo: Sarcomastigophora Honiberg & Balamuth 1963

Subfilo: Mastigophora Diesing 1866

Classe: Zoomastigophora Calkins 1909

Ordem: Kinetoplastida Vickerman 1976

Subordem: Trypanosomatina Kent 1880

Família: Trypanosomatidae Grobden 1905

Gênero: *Leishmania* Ross 1903

Subgênero: *Viannia* Vianna 1911

Espécie: *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna 1911

2.3 Uso de Plantas Medicinais

O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até nas grandes cidades, plantas para uso medicinais são vendidas em feira e mercados populares. Por conta disso esse tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudo envolvendo áreas multidisciplinares (MACIEL *et al.*, 2002).

As plantas de uso medicinal e seus derivados constituíram durante muito tempo a base da medicina e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, estão relacionados aos princípios isolados de plantas (UGAZ, 1994, CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Isto se deve a uma grande variedade de espécies (205-500 mil) de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991). O Brasil é detentor de grande biodiversidade, possui cerca de 120.000 espécies vegetais, das quais somente cerca de 10% foram estudadas segundo aspectos químicos e farmacológicos (KOROLKOVAS, 1988).

O estudo das drogas vegetais constitui um campo inesgotável de novos conhecimentos científicos podendo contribuir para o aprimoramento da medicina tradicional (SIXEL, 1998).

As vantagens no desenvolvimento das pesquisas farmacológicas com plantas são de grande alcance social, permitindo que as informações sejam retornadas a população (CARLINI, 1983). Nesse contexto, a biodiversidade brasileira é de grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, na tentativa de descoberta de novos medicamentos para uso terapêutico de várias enfermidades que assolam a população (HOEHNE, 1978).

Dentro dessa biodiversidade está a família Ochnaceae que são plantas angiospérmicas e compreende cerca de 600 espécies distribuídas em 40 gêneros encontrados nas regiões pantropicais do mundo, sendo que sua maior diversidade encontra-se na América do Sul (HEYWOOD, 1978). São plantas essencialmente arbóreas e arbustivas, com folhas geralmente inteiras, de distribuição alternada, com estípulas, raramente ervas. Flores geralmente vistosas, freqüentemente amarelas de simetria radial (raramente zigomorfa), diclamídeas e hermafroditas. Sépalas e pétalas geralmente em cinco e livres entre si (JOLY, 1998). A família pode ser dividida em duas subfamílias (Ochnoideae e Sauvagesioideae) supostamente monofiléticas, caracterizadas por sinapomorfias (AMARAL, 1991). Estudos filogenéticos utilizando dados de seqüenciamento do gene *rbcL* suportam a hipótese de que essas duas subfamílias são proximamente relacionadas, formando um grupo monofilético (FAY *et al.*, 1997).

As espécies que constituem a família Ochnaceae são pouco conhecidas, tanto do ponto de vista químico como biológico. Esta família está quimicamente caracterizada principalmente por produzir flavonóides, destacando-se os bioflavonóides (FELÍCIO *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 1994; VELANDIA *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 1999). Estudos químicos e farmacológicos de espécies desta família chamam a atenção por conta da presença de diversos constituintes biologicamente ativos, com grande potencial para aplicação medicinal.

O gênero mais rico em espécies é *Ouratea* (Figura 3) que compreende cerca de 300 espécies distribuídas principalmente na América do Sul. Estudos químicos e farmacológicos foram realizados com várias espécies do gênero *Ouratea* (MOREIRA *et al.*, 1994, VELANDIA, 1997). Nesses estudos, foram detectados várias atividades biológicas entre as quais, estão a inibição do crescimento de tumores em murinos, efeitos antiproliferativos e ativação de apoptose em células tumorais por bioflavonóides isolados de duas espécies pertencente a esse gênero (GRYNBERG *et al.*, 1994; GRYNBERG *et al.*, 1998), atividade antiviral ROMING *et al.* (1992), antimicrobiana PAULO *et al.* (1986), também usado com

atividade analgésica VASILEVA (1969). Espécies de *O. spectabilis* do Brasil são usadas na medicina popular para o tratamento de sofrimentos gástricos e reumáticos. Recentemente FELICIO *et al.* (1995) demonstrou que um biflavonóide isolados da folhas de *O. spectabilis* inibia a aldalse redutase que é uma enzima de poliol, a qual está envolvida na redução da glicose a sorbitol na presença de NADPH. O aumento da atividade desta enzima está relacionado com patogêneses de muitas complicações de diabetes, tais como catarata, retinopatia e neuropatia.

Estudos químicos com diferentes espécies de *Ouratea* levaram ao isolamento de várias substâncias com potencial biológico, entre elas estão isoflavonóides, bi-isoflavonóide, triterpenos (MOREIRA *et al.*, 1994), biflavonas (FELICIO *et al.*, 1995) e recentemente, flavonóides glicosídeos, cloro-isoflavonóides, nor-isoprenóides, ligninas, diterpenos, triterpenos e esteróides (VELANDIA, 1997; VELANDIA *et al.*, 1998) e dois biflavonoides (FELICIO *et al.*, 2001; MBING *et al.*, 2003).



Figura 3. *Ouratea cuspidata* depositada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Ouratea cuspidata (St. Hil.) Engl. conhecida popularmente de vassoura-de-feiticeira pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Malpighiales, família Ochnaceae e gênero: *Ouratea* possui ramos cilíndricos, pecíolo de 3-4 mm de comprimento, canaliculado, lâmina de 10-15 cm de comprimento, ramos de 10 cm, angulosos e lisos, pedicelos 3-5 mm de comprimentos, botão de 6-7mm de comprimento e 3 mm de largura, sépala de 7-8mm de comprimento, as internas de 2,5 mm de largura com a margem de 1 mm, pétalas de 8-9 mm de comprimento e 6 mm de largura, unguiculadas, anteras subuladas de 6-7 mm de comprimento, transversalmente rugosa, estiletos filiformes de 8 mm de comprimento (CORREIA, 1975).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitas

Foi utilizada a cepa 566 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cedida pelo Departamento de Microimunoparasitologia da Instituição de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (IPRC/FIOCRUZ).

3.2 Cultivo *in vitro* de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Para o cultivo *in vitro*, os protozoários foram mantidos em meio bifásico (NNN), onde o ágar sangue constituiu a fase sólida e o meio BHI (Brain Heart Infusion), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB – GIBCO), a fase líquida. Os cultivos foram realizados à temperatura à 26-28°C em estufa biológica com múltiplas repetições, as quais visaram a manutenção desta cepa em nosso laboratório. Os inóculos (formas promastigotas) foram estabelecidos pela contagem em câmara hemocitométrica (Neubauer), seguida de diluições proporcionais, de modo que o inóculo inicial fosse de 10⁴ parasitas para cada mL de meio líquido. O crescimento parasitário foi acompanhado pela contagem de alíquotas diárias, as quais foram submetidas a quantificação em câmara hemocitométrica. O número de parasitas viáveis foi estimado através da metodologia clássica, como descrito por LENNETTE & SCHIMIDT (1979). Para cada cultivo iniciado, foi elaborada uma curva de crescimento, onde as suspensões celulares obtidas foram adicionadas de 10% de uma solução de azul de Trypan - CI 23850 (J.T. Baker Chemical Co. , USA) e mantidas em repouso durante dez minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram sedimentadas sob baixa rotação (100 rpm) durante dez minutos em centrifuga clinica convencional Ecelsa 2, mod. 205 (FANEM, Brasil). O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foi adicionado solução salina tamponada em volume equivalente ao da alíquota inicial. As células coradas e não coradas foram quantificadas hemocitometricamente sob aumento de 400x em microscópio óptico comum BX-41 (Olympus, Japão). As células mortas se tornam coradas, enquanto que as células viáveis excluem o corante, permanecendo incolores. O percentual de viabilidade foi estimado de acordo com a seguinte fórmula :

$$V\% = \frac{NCV - NCM}{TCC} \times 100$$

Onde , V% = Percentual de Viabilidade; NCV = Número de células vivas;
NCM = Número de células mortas; TCC = Total de células contadas.

3.3 Cultivo de Macrófagos Peritoniais de Hamsters Saudáveis

No ensaio com macrófagos do hospedeiro vertebrado foram utilizados lavados peritoneais de acordo com a metodologia descrita na literatura (HERSCOWITZ *et al.*, 1981), adaptada para nossas condições experimentais, de acordo com (HERZOG-SOARES & FREIRE, 2004).

Hamsters *Cricetus cricetus* pesando, aproximadamente 24g, foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 ml de suspensão de Sephadex G-50 a 3% em solução salina tamponada com fosfatos (8,0 g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, H₂O q.s.p

1000mL, pH 7,2). Dois dias após a inoculação, as cavidades peritoneais dos animais foram lavadas com 5 mL de uma solução de citrato de sódio a 3% e acondicionadas em banho de gelo. As células obtidas foram centrifugadas a 600rpm/10⁰C por 15 minutos (três vezes), para a retirada do anticoagulante e demais interferentes presentes nos lavados peritoneais. O sedimento final (pellet) foi ressuscitado em 1 mL de meio Mit-Glutami Ohne-NaHCO₃ (RPMI 1640- Difco-Inglaterra) e submetido a ensaios de viabilidade e à contagem do número de células em câmara hemocitométrica (Neubauer). Foram realizadas suspensões em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina G potássica e 50 mg/mL de estreptomicina, de modo a obter-se 10⁶ células por mL. Alíquotas de 2 mL foram adicionadas em placas de poli-estireno, de fundo chato (TPP Zellkultur Testplatte 6, Switzerland), previamente esterilizadas. As suspensões foram incubadas durante 48 horas a 37⁰C, 90% umidade e 5% de CO₂. Após esse período as células não aderentes foram retiradas e o meio substituído, de modo a manterem-se cultivos purificados de macrófagos peritoneais viáveis que foram utilizados nas etapas subseqüentes envolvendo dosamentos funcionais e processos inflamatórios decorrentes de infecções por *L. (V.) braziliensis*.

3.4 Ensaios de Bioproteção Contra a Geração de Radicais Livres

Diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata*, do extrato hexânico e do extrato de acetato de etila de *Ouratea cuspidata* foram adicionadas a sistema biológico gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), constituída de 0,2 mL de uma suspensão contendo 16 mg/mL de eritrócitos de carneiro, 2 mM de deoxirribose, 100 mM de FeCl₃. Cada frasco foi incubado a 45°C durante 60 minutos e adicionado de 0,65 mL de solução de ácido Tiobarbitúrico (TBA) previamente dissolvido em acetonitrila numa concentração de 10,3mM. Após incubação a 95-100 °C por 10 minutos e em seguidas os tubos foram lidos a 540 nm e a concentração de TBARS determinada contra uma curva padrão malonildialdeído em nnoMoles por mL.

3.5 Curva de Crescimento:

Foi empregada a metodologia clássica da avaliação numérica de formas parasitárias desenvolvidas em meio acelular, conforme descrito na literatura (JENSEN, 1983). Para cada cultivo iniciado, foi elaborada uma curva de crescimento, onde as absorbâncias das suspensões celulares, tratadas com as diferentes concentrações de extrato metanólico, foram colorimetricamente medidas no comprimento de onda de 540nm. Os valores turbidimétricos obtidos foram associados à quantificação hemocitométrica (câmara de Neubauer) das alíquotas dos tratamentos nos diferentes intervalos de tempo, gerando curvas de crescimento quantitativo das formas promastigotas em meio axênico.

3.6 Avaliação da Viabilidade Celular

O efeito do extrato metanólico de *O. cuspidata* sobre as promastigotas de *L.(V.) braziliensis* e células hospedeiras (macrófago) conforme CAMACHO *et al.* (2002). O ensaio realizado em microplaca de 96 orifício contendo 10⁶ formas promastigotas por mL em meio de cultura contendo 5 diferentes concentrações do extrato metanólico (2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 16mg/mL e 32mg/mL). A placa foi incubada a 26 °C em estufa biológica por 24 h, para cada concentração foram feitas 4 repetições. Os quais foram avaliados pelo teste do Azul de Trypan e submetidas às avaliações microscópicas para a caracterização da viabilidade e de alterações morfológicas relacionadas ao processo de morte celular programada (morte natural), ou apoptose. A avaliação da apoptose foi realizada de acordo com as metodologias descritas por SCHWARTZ & OSBORN (1995). As células coradas e não coradas foram quantificadas hemocitometricamente sob aumento de 400x em microscópio óptico comum BX-41 (Olympus, Japão).

3.7 Análise da Atividade Mitocondrial

O efeito dos tratamentos sobre a atividade mitocondrial foi medida através da taxa de atividade das desidrogenases mitocondriais, medido através da metodologia descrita na literatura (BERG *et al.*, 1994; HAYES, 2001; DUTTA *et al.*, 2005), onde a taxa de atividade das desidrogenases mitocondriais, foi aferida através do desdobramento do azul de Tetrazólio (MTT), assimilado pelas células viáveis, com a geração de cristais de formazanas intracelulares.

As células foram previamente cultivadas em meio BHI em microplacas de fundo chato com 96 orifícios, contendo 10^6 formas promastigotas por mL e tratadas com várias concentrações do extrato metanólico de *O. cuspidata*, durante 24 horas. Posteriormente, as células foram centrifugas o meio de cultura foi aspirado e as células foram ressuspensas com 100 μ L de uma solução de MTT em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), na concentração de 2 mg/mL e encubadas durante quatro horas a 37 °C na ausência de luz. Os cristais de formazana oriundos da redução enzimática do corante pelas células viáveis, foram dissolvidos em dimetil-sulfóxido (DMSO) na concentração de 5%. A atividade mitocondrial foi estimada através de leitura espectrofotométrica a 492nm.

A intensidade da cor azulada desenvolvida nas células controle, foi considerada como representando 100 % de viabilidade em todas as medidas realizadas. Todas as comparações posteriores foram baseadas nesse critério de referência. Comparativamente foram realizados testes de controle negativo, onde a absorbância do MTT e do veículo, nas diluições de 1:2 foram avaliadas, na ausência de células.

3.8 Índice Terapêutico

Foram realizados testes laboratoriais visando determinar a citotoxicidade relativa do extrato testado e de se estabelecer o provável índice terapêutico, ou possíveis efeitos adversos, para o uso medicinal de *O. cuspidata*. Foram realizados ensaios, em células hospedeiras, quanto em células parasitárias, envolvendo bioproteção contra substâncias oxigênio-reativas (radicais livres), atividade anti-inflamatória (fagocitose de partículas inertes após tratamento com diferentes concentrações do extrato metanólico), viabilidade celular (ensaio de exclusão do azul de Trypan – controle da permeabilidade das membranas celulares) e funções bioquímicas (ensaios de atividade mitocondrial).

Os resultados obtidos permitiram a avaliação da especificidade antiparasitária do extrato metanólico, a sua citotoxicidade presumida e, conseqüentemente, a estimativa do índice terapêutico (IT), seguindo o preconizado na literatura (KLAASSEN & WATKINS III, 2003). Assim, procurou-se definir a razão entre a dose necessária à produção de um efeito tóxico e aquela necessária para originar o efeito anti-parasitário desejado. Buscou-se determinar a dose efetiva necessária para causar 50% de ação anti-parasitária ($ED_{50\%}$), e a dose letal, ou minimamente tóxica, capaz de afetar 50% dos indivíduos (células hospedeiras) expostos aos dos constituintes do extrato metanólico ($LD_{50\%}$). O provável IT dos constituintes químicos dos extratos vegetais foi determinado através da fórmula abaixo, onde IT (Índice Terapêutico) é o resultante da razão entre a dose média de extratos de *O. cuspidata* capazes de causar algum tipo de toxicidade, em pelo menos, 50% dos indivíduos que compreendem o sistema hospedeiro ($LD_{50\%}$) e, a dose capaz de causar a morte de, pelo menos, 50% das formas promastigotas de *L. (Viannia) braziliensis* ($ED_{50\%}$).

$$IT = \frac{LD_{50\%}}{ED_{50\%}}$$

Com base nos resultados obtidos, procurou-se, também, estabelecer a margem de segurança a exposições ao extrato metanólico de *O. cuspidata* e a relação entre a eficácia e a potencia das preparações.

3.9 Avaliação da Capacidade de Fagocitose dos Macrófagos

A capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoniais dos hamsters foi avaliada pelo método previamente descrito por (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). Os macrófagos foram cultivados em quatro repetições na presença de 5 concentrações de extrato metanólico (2mg/mL, 4mg/mL, 8 mg/mL, 16mg/mL e 32 mg/mL) por 2 horas. As células foram centrifugadas a 600rpm/10⁰C por 15 minutos (três vezes), para a retirada do sobrenadante e novamente acrescidas de meio RPMI-1640 adicionado de uma suspensão de Zymozan equivalente a uma concentração de 5-10mg/mL de partículas inertes para cada 10⁶ macrófagos peritoneais. Após 1 hora de incubação a 37⁰C (5% CO₂) as células foram novamente centrifugadas por três vezes consecutivas, para a retirada das partículas de Zymosan que não foram fagocitadas. As células foram fixadas e coradas pelo Panótico (hematoxilina-Eosina), e avaliadas quanto à capacidade fagocítica, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IF = \frac{\text{Número de M}\phi \text{ que fagocitaram 3 ou mais partículas}}{\text{Número total de M}\phi \text{ contados}} \times 100$$

Onde IF corresponde ao índice fagocítico (%) e M ϕ corresponde aos macrófagos.

3.10 Seleção da Espécie Vegetal

Entre os constituintes freqüentemente encontrados nas diferentes espécies de *Ouratea* destacam-se os triterpenóides, tais como a friedelina, com atividade anti-úlcera, anti-inflamatória, anticonvulsivante, fitogênica e antitumoral (CHATUVERDI *et al.*, 1974, QUEIROGA *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2004).

A ação antifagocitária destes triterpenóides, com inibição das funções de captura e digestão através da inibição de enzimas fagocitárias, em detrimento da geração de derivados do óxido nítrico, são considerados como fundamentais para a expressão de sua atividade antiparasitária, levando-os a eliminar tanto formas promastigotas, quanto amastigotas intratecduais (TORRES-SANTOS *et al.*, 2004). A inibição metabólica causada pelos triterpenóides também se relaciona à inibição de topoisomerases e estão vinculadas à ação antitumoral claramente evidenciada para espécies vegetais do gênero *Ouratea* (GRYNBERG *et al.*, 1994, GRYNBERG *et al.*, 1998) e podem ser um atributo de qualidade na seleção de futuras drogas inibidoras de fosfatases no controle da leishmaniose (BARRET *et al.*, 1999).

Outro constituinte freqüentemente encontrado no gênero *Ouratea* é a antranorina que, a despeito de sua atividade alergênica e fotossensibilizantes, apresenta atividades antimicrobiana e antitumoral acentuadas (TURK *et al.*, 2006). A amentoflavona que é uma bis-apigenina, ou biflavonóide, também é freqüentemente encontrada no gênero *Ouratea* e atua nos canais de cálcio aumentando sua liberação. A este biflavonóide, atribui-se, ainda, atividade mutagenica, antiulcerogenica, antiinflamatória (inibidor específico da ciclooxigenase COX2), inibidor da fosfolipase A2, efeito neutralizador de veneno de serpentes, antidiapnéica (calmante), inibidora das monoxigenases relacionadas a xenobióticos aromáticos cancerígenos (anticancerígena).

A evidência obtida de estudos anteriores sobre a atividade antiinflamatória, antitumoral e antimicrobiana presente nos constituintes químicos de algumas espécies do gênero *Ouratea*,

nos estimulou a investigar o potencial do extrato vegetal de *O. cuspidata* para o controle da leishmaniose tegumentar.

3.11 Obtenção do Material Vegetal

As amostras de *Ouratea cuspidata* empregadas no presente trabalho, foram coletadas na orla marítima do município Barra de Maricá, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foi feita uma excisão da planta coletada que foi identificada pela botânica Dr^a. Luci Dicenna Vale. Espécimes representativos da planta foram depositadas no Herbarium do Museu Nacional do Rio de Janeiro-RJ. Brasil (N^o 206313).

3.12 Obtenção e Preparo dos Extratos Vegetais

Folhas secas de *O. cuspidata* (580g) foram pulverizadas e extraídas com hexano, acetato de etila e metanólico por maceração em temperatura ambiente. O extrato foi concentrado a vácuo para produzir os resíduos A (29,69g), B (36,27g) e C (117,08g) hexano, acetato de etila e metanol respectivamente. As frações secas da planta foram previamente solubilizadas em PBS e esterilizadas por filtração através de membranas com 0,22 μ de diâmetro de porosidade (Nalgene, USA). O material solubilizado e esterilizado foi identificado e acondicionado à temperatura de -20°C para o uso posterior nas diferentes etapas dos ensaios biológicos.

3.13 Análise Estatística dos Resultados

Todos os resultados apresentaram quatro repetição e foram apresentados como a média \pm o erro padrão (MEP). Os valores médios foram avaliados quanto à significância estatística através de ANOVA. As comparações múltiplas dos dados pareados foram realizadas através do teste T de Student, considerando como significativas diferenças entre os valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

No presente trabalho foi possível evidenciar os efeitos biológicos relativos aos constituintes químicos presentes em extratos de *Ouratea cuspidata*, com polaridade e ação diferenciadas. Os resultados obtidos permitiram avaliar o potencial medicinal, sugerir um provável mecanismo de ação para os constituintes presentes nos extratos vegetais e demonstrar que: a) o extrato metanólico apresentou maior potencial terapêutico, quando comparado com os demais extratos (acetato de etila e hexânico); b) o extrato metanólico apresentou ação anti-inflamatória caracterizada pela perda da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de hamsters adultos (*Cricetus cricetus*); c) a viabilidade das células hospedeiras foram mais afetadas pelas concentrações mais elevadas do extrato metanólico que as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*; d) as concentrações do extrato metanólico mostraram-se atóxicas para as células hospedeiras e determinaram alterações morfológicas em promastigotas de *L. braziliensis*; e) as alterações morfológicas observadas foram proporcionais ao aumento da atividade do metabolismo enzimático-mitocondrial parasitário; f) as concentrações mais baixas do extrato vegetal apresentaram maior atividade antiparasitária e ação bioprotetora contra radicais livres que as doses mais elevadas do extrato (hormese), permitindo uma estimativa do potencial terapêutico no tratamento das manifestações cutâneas por *Leishmania braziliensis*.

Os efeitos biológicos de bioproteção, relativos aos extratos hexânico (OCH), metanólico (OCMeOH) e acetato de etila (AcEt), foram comparativamente avaliados em função dos seus potenciais de eliminação de radicais livres. A determinação quantitativa dos TBARS foi realizada de acordo com uma curva de ajuste, previamente estabelecida com um padrão comercial, de malonildialdeído (MDA) e foi expressa em nanoMoles (nM) de MDAmL (Figura 4). A curva padrão obtida apresentou grande reprodutibilidade, com R^2 superior a 0,9 e tendência exponencial, com correlação direta entre a concentração de MDA (TBARS) e a absorbância observada a 532 nm.

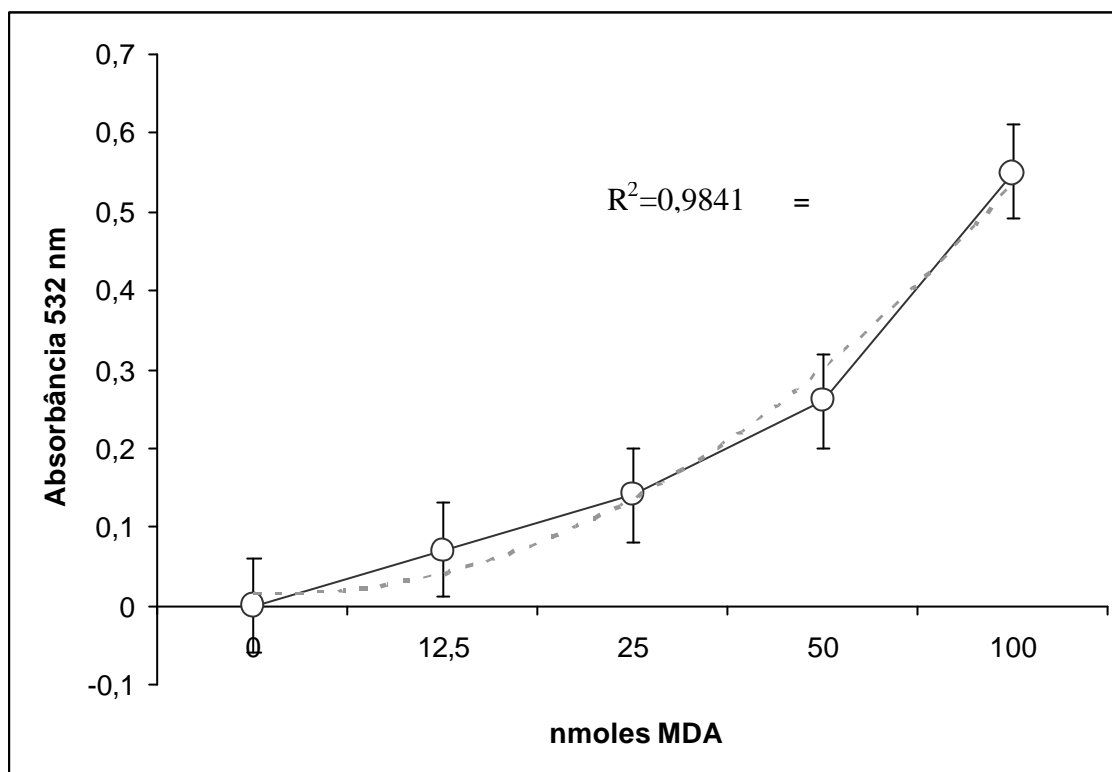


Figura 4 Curva padrão de malonildialdeído (MDA) gerada através da indução de radicais livres, medidos espectrofotometricamente a 532nm frente a um padrão de malonildialdeído adquirido comercialmente (Fisher, USA, AC14861-1000). Os resultados representam a média de quatro repetições adicionadas do erro padrão ($p=0,01$).

Nos ensaios de bioproteção, pela eliminação de radicais livres (Figura 5), ficou evidente que o extrato OCM_{OH}, de polaridade intermediária, apresentou atividade protetora, com eliminação de TBARS. Na concentração de 0,2 mg/mL houve a diminuição de 98% das substâncias oxigênio-reativas. Nas concentrações de 25 e de 60 mg/mL, entretanto, esta atividade bioprotetora mostrou-se progressivamente diminuída, com a detecção respectiva de 71% e 24,4%. Os demais extratos avaliados não apresentaram ação inibitória da geração de radicais livres nessas concentrações. De outro modo, ficou evidente que todos os extratos apresentaram potencial tóxico, uma vez que induziram a formação de concentrações elevadas de radicais livres, quando adicionamos na concentração de 100mg/mL. A produção de TBARS foi entre duas a quatro vezes maior que a concentração de radicais livres produzidos produzidos pelo sistema controle.

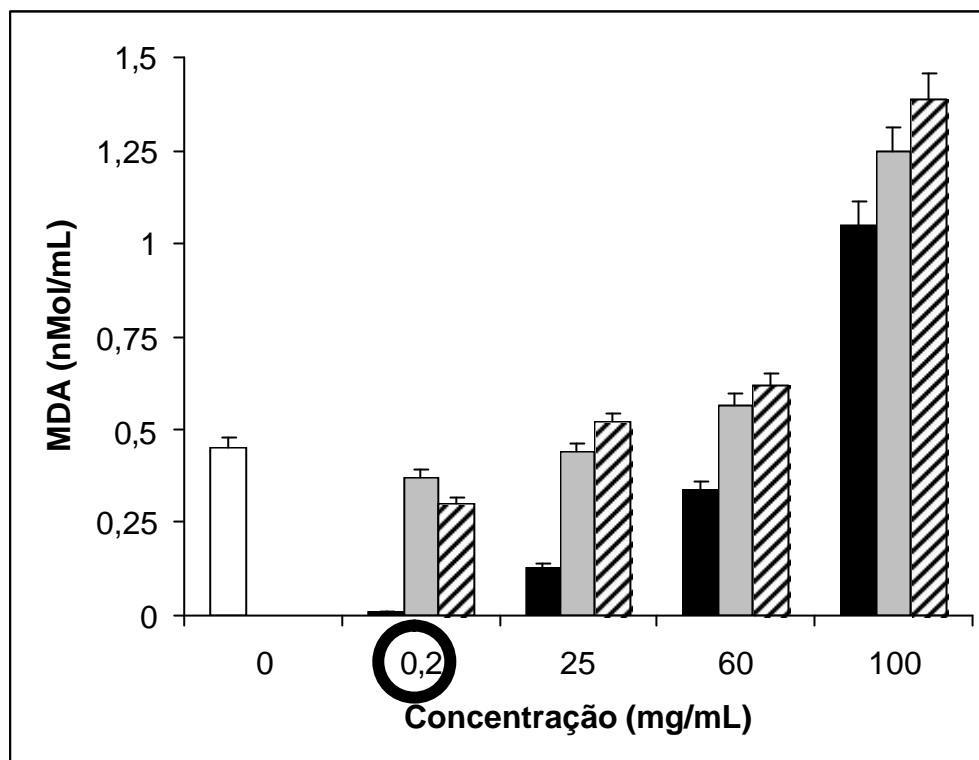


Figura 5. Ensaio de redução de radicais livres com extratos de *Ouratea cuspidata*. Concentrações diferentes do extrato metanólico (barras negras), do extrato hexânico (barras cinzas) e do extrato acetato de etila (barras listradas) foram adicionadas a sistema biológico gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os tubos foram lidos a 540 nm e a concentração de TBARS determinada contra uma curva padrão malonildialdeído (barra branca) em nnoMoles por mL. Os resultados são a média de quatro repetições acrescidas do erro padrão ($p=0,5$). O círculo evidencia a maior eficiência bioprotetora da fração metanólica em relação às demais.

A atividade antiinflamatória da fração OCM_eOH foi evidenciada pela inibição crescente da capacidade de ingestão de partículas de Zymozan por macrófagos peritoneais de hamsters (M ϕ) quando adicionados de diferentes doses de OCM_eOH (Figura 6). A atividade macrofágica consistiu da contagem microscópica do número de células que havia fagocitado três ou mais partículas após incubação por duas horas a 37°C, 5% CO₂ na presença das concentrações de 2, 4, 8, 16 e 32 mg de OCM_eOH por 10⁶ M ϕ em 1 mL de meio RPMI-1640 (Difco, Inglaterra), na ausência de aditivos, ou soro.

Os resultados foram comparados aos controles constituídos de M ϕ não tratados e expressos em percentuais de atividade fagocítica.

A capacidade fagocítica, assim determinada, diminuiu drasticamente à partir da exposição à concentração de OCM_eOH equivalente a 16 mg/10⁶ M ϕ /mL, onde observou-se uma capacidade de ingestão equivalente a 8% da capacidade fagocítica observada nos controles (M ϕ não tratados).

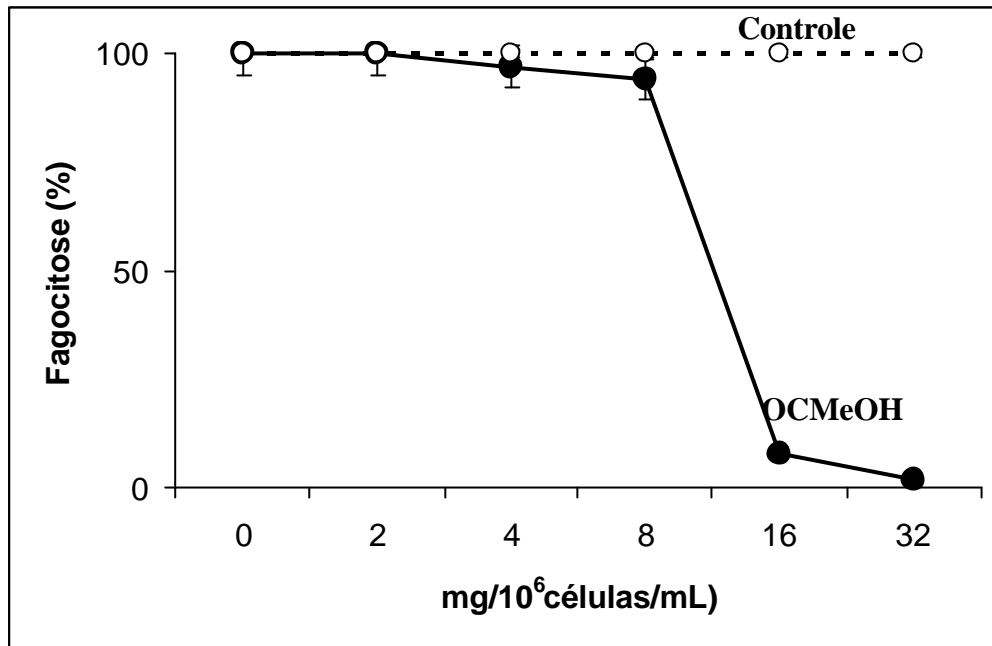


Figura 6. Percentual de endocitose de partículas inertes (Zymozan) em macrófagos peritoneais de hamsters (*Cricetus cricetus*) tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) durante duas horas a 37°C, 5% CO₂, em comparação ao controle constituído por células não tratadas. Os resultados estão expressos como sendo a média de quatro repetições por concentração analisada adicionados do erro padrão (p=0,01).

A exposição à concentração de 32 mg de OCMeOH/10⁶ Mφ/mL causou uma inibição de 98% da capacidade fagocítica em relação ao controle. A perda da função fagocitária foi irreversível, uma vez que os macrófagos tratados com as doses limitantes do extrato vegetal, quando lavados por centrifugações sequenciais e adicionados em meio de cultivo livre de aditivos, na presença de soro fetal bovino inativado, não recuperaram suas funções metabólicas.

A presença de alterações morfológicas e a viabilidade relativa das células hospedeiras (Mφ) foi comparativamente avaliada em relação às formas promastigotas de *L. braziliensis* (L566) frente a diferentes concentrações de OCMeOH (Figura 7).

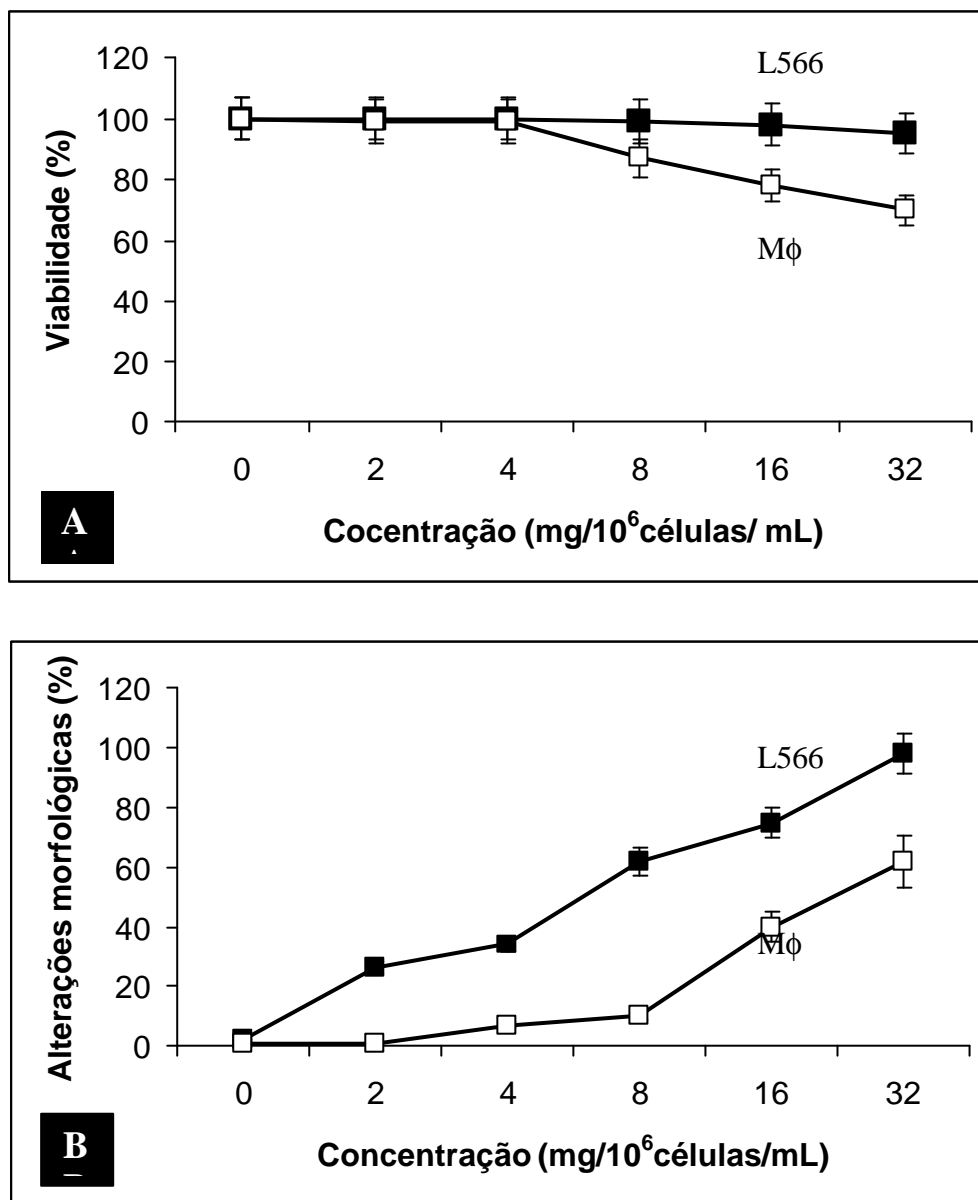


Figura 7. Viabilidade (A) e alterações morfológicas (B) de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (L566) e de macrófagos peritoneais (Mφ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouatea cuspidata*. Os pontos assinalados representam a média de quatro observações adicionadas do erro padrão. As diferenças foram analisadas através de ANOVA, sendo considerados significativas quando $p=0,05$.

A viabilidade e alterações morfológicas foram avaliadas através do ensaio de exclusão do azul de Trypan- CI 23850 (J.T. Baker Chemical Co. , USA). As células coradas foram quantificadas hemocimetricamente sob aumento de 400x em microscópio óptico comum BX-41 (Olympus, Japão). Nesse ensaio foi observado que as formas promastigotas permaneceram viáveis em todas as concentrações de OCMeOH, as alterações morfológicas apareceram a partir da exposição à concentração equivalente a 2 mg/10⁶ L566/mL. A exposição às concentrações de 8, 16 e 32 mg de OCMeOH/10⁶ L566/mL, respectivamente causou a deformação de 62%, 78% e 98% das células que perderam suas características de forma,

tornando-se totalmente redondas, mas ainda com flagelos, sugerindo tratar-se de células defectivas e não de formas amastigotas (Figura 8).

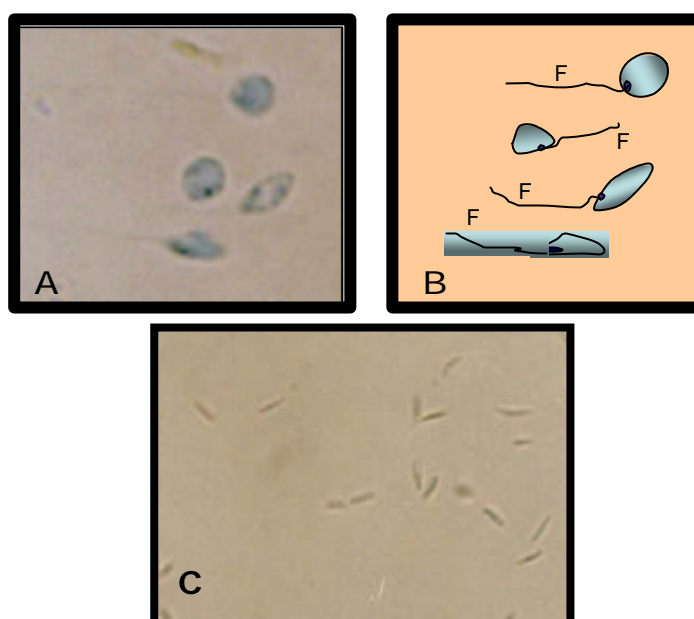


Figura 8. Fotomicrografia de promastigotas de *L. braziliensis* (A), e a correspondente representação gráfica (B), em ensaio de viabilidade celular pela exclusão do Azul de Trypan. As células apresentaram-se arredondadas, evidenciando o pleiomorfismo induzido pelo tratamento por 4 horas com 8mg/mL de extrato metanólico de *O. cuspidata* para cada 10^6 promastigotas. Microscopia convencional: aumento de 1000 x. As células do controle (C) sem alterações morfológicas. Microscopia convencional: aumento de 400X. A notação F na representação gráfica corresponde ao flagelo parasitário.

A viabilidade das células hospedeiras (M ϕ) foi mais afetada quando comparadas com as promastigotas (L566). Nas concentrações de 2 e 4 OCM_{EtOH}/10⁶ M ϕ /mL somente 1% das células não se apresentavam viáveis. A viabilidade dos M ϕ , diminuiu gradativamente a partir da exposição à concentração de OCM_{EtOH} equivalente a 8, 16, 32 mg/10⁶ M ϕ /mL, onde observou-se viabilidade de 87%, 78% e 70%, respectivamente. Em relação a alterações morfológicas os M ϕ foram menos afetados que as L566. As alterações foram visualizadas somente em M ϕ tratados com as doses iguais ou superiores a 4 mg de OCM_{EtOH}/10⁶ M ϕ /mL nesta concentração 7% das células apresentaram alguma alteração morfológica. Nas concentrações de 16 e 32 mg de OCM_{EtOH}/10⁶ M ϕ /mL as alterações morfológicas foram compatíveis com as ocorrentes em processos apoptóticos, com fragmentação nuclear, aparecimento de bolhas citoplasmáticas e fragmentação celular (Figura 9). Nas concentrações de 16 e 32 mg de OCM_{EtOH}/10⁶ M ϕ /mL foram observadas alterações em 40% e 62%, dos M ϕ tratados, respectivamente.

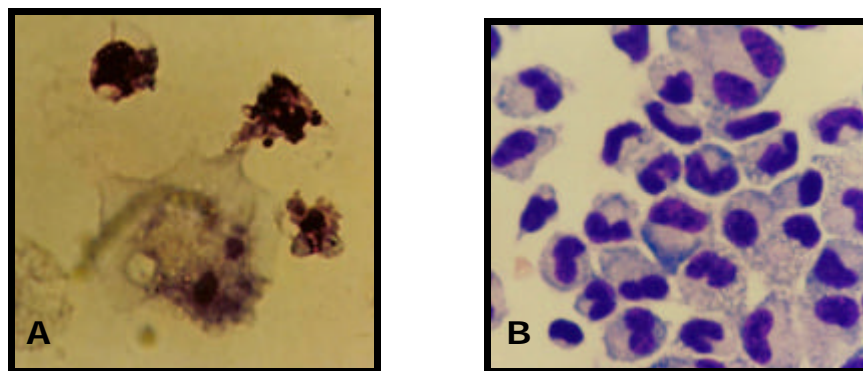


Figura 9. Macrófagos corados pela Hematoxilina-Eosina.. As células apresentaram-se com alterações morfológicas compatíveis com processos apoptóticos induzido pelo tratamento por 24 horas com 32mg/mL de extrato metanólico de *O. cuspidata* para cada 10^6 macrófagos (A). Células controle sem alterações morfológicas (B). Microscopia convencional: aumento de 1000 x.

A atividade enzimática mitocondrial das formas L566 e dos $M\phi$, foi aferida através do ensaio de desdobramento do azul de Tetrazólio (MTT), onde esse substrato foi convertido em cristais de formazana pelas desidrogenases mitocondriais celulares, após exposição, por 24 horas, a diferentes concentrações de OCMeOH (Figura 10). Os resultados indicaram haver alteração das funções mitocondriais nos $M\phi$ tratados, que apresentaram diminuição da capacidade de desdobrar o metiltetrazólio em cristais de formazanas pelos ($M\phi$) tratados, quando comparados com o controle ($M\phi$ não tratados) (Figura 10B). Nesse caso, a atividade mitocondrial foi gradativamente afetada, sendo diretamente relacionada ao aumento das concentrações de OCMeOH. Foi observada uma diminuição da atividade enzimática intracelular em 13,51%, 33,7% e 51,35%, nos tratamentos com 8, 16 e 32 mg de OCMeOH/ 10^6 $M\phi$ /mL .

Embora as L566 também tenham sido afetadas pelo tratamento, tal efeito não apresentou correlação direta entre a dose de OCMeOH e a diminuição da atividade enzimática (Figura 10A).

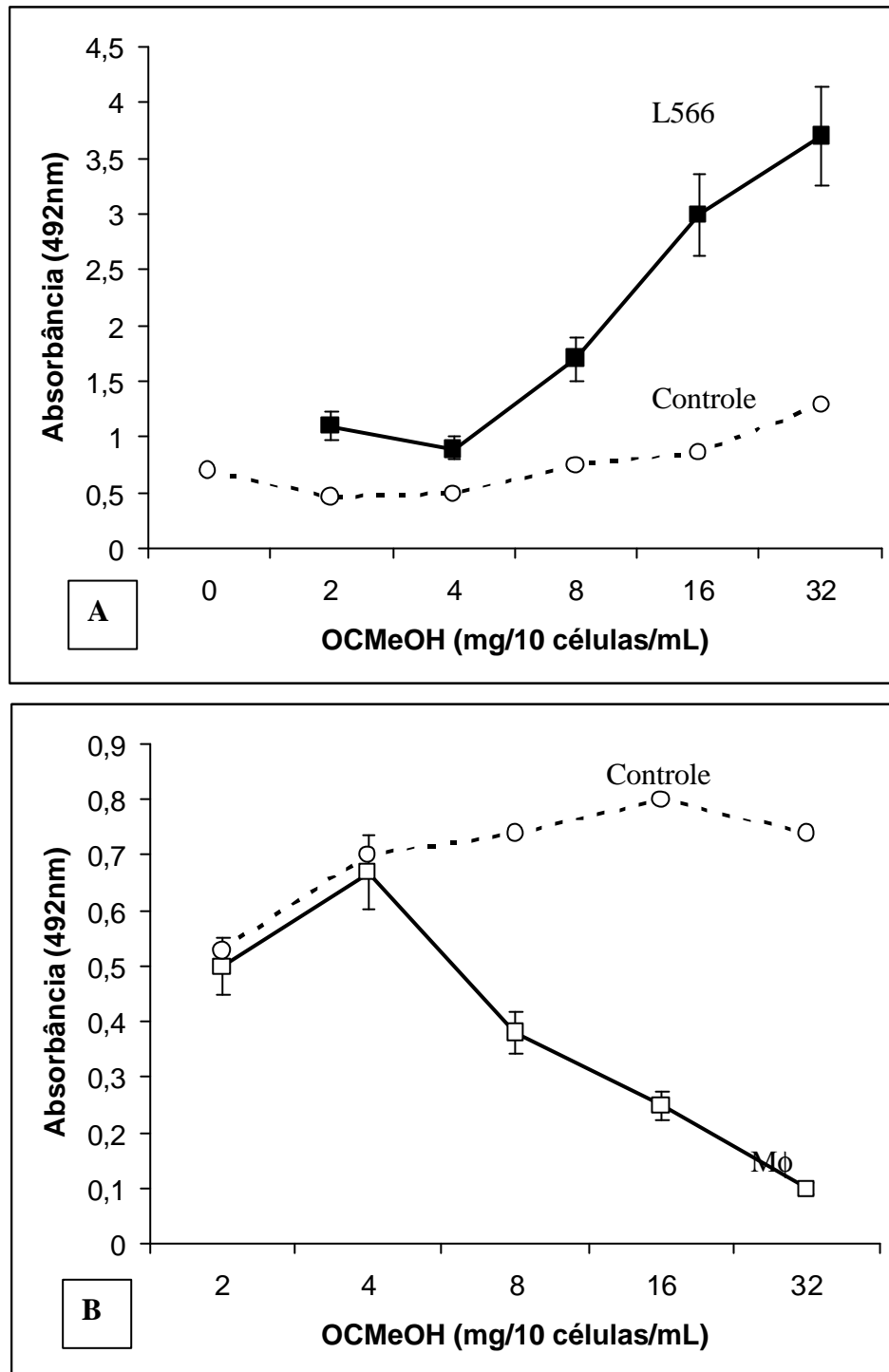


Figura 10. Medidas de Absorbância da atividade enzimática mitocondrial em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566) (A) e de macrófagos peritoneais (Mφ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) (B), através da dosagem de cristais deformazanas, geradas pelo desdobramento fisiológico do brometo de metiltetrazólio (MTT), após exposição por 24 horas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). N= 5 (p=0,05).

Embora tenha havido uma diminuição de 26% da atividade mitocondrial parasitária em L566 tratadas com 4mg/10⁶ L566/mL, em relação ao tratamento com 2 mg/10⁶ L566/mL,

a atividade mitocondrial das promastigotas foi sempre superior a atividade detectada nas L566 não tratadas (controle), sugerindo terem sido a uma aceleração metabólica induzida pelo tratamento com OCMeOH (Figura 10A). Nas concentrações 8, 16, 32 mg de OCMeOH/10⁶ L566/mL houve um aumento de 220%, 389% e 480%, respectivamente, na atividade enzimática parasitária. O aumento na atividade metabólica mitocondrial evidenciado nas formas L566 apresentou correlação direta com o aumento das taxas de proliferação celular observado nas avaliações do crescimento de promastigotas frente às mesmas concentrações de OCMeOH (Figura11), sugerindo que constituintes do extrato possam afetar mitose parasitária.

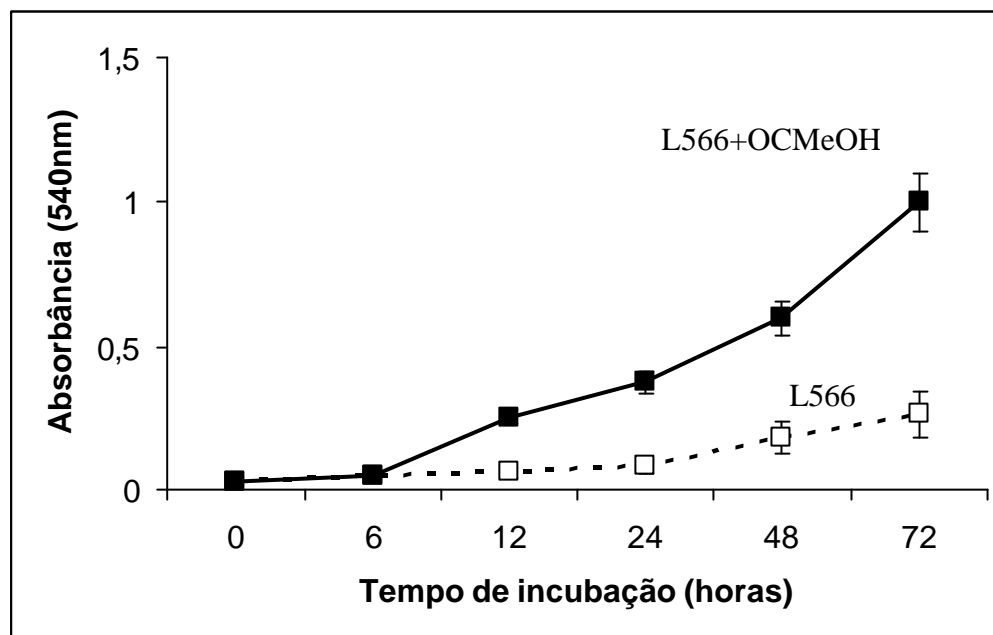


Figura 11. Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566+OCMeOH) em meio axênico bifásico (NNN) adicionado de 16 mg/mL de extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH), em relação ao sistema controle (L566) constituído de promastigotas não expostas ao extrato. Os resultados expressam a média de quatro observações turbidimétricas, adicionadas do erro padrão ($p=0,01$).

A avaliação das alterações morfofisiológicas presentemente detectadas sugeriu que OCMeOH exerça efeitos distintos para ambos, células hospedeiras e promastigotas. Tal possibilidade foi corroborada através de ensaios de bioproteção *in vitro*, nos quais comprovou-se que as doses atóxicas para as células hospedeiras corresponderam àquelas que melhor eliminaram substâncias oxigênio-reativas ocorrentes pela indução artificial de TBARS em membranas eritrocitárias, através de mecanismos não enzimáticos (Figuras 5 e 12).

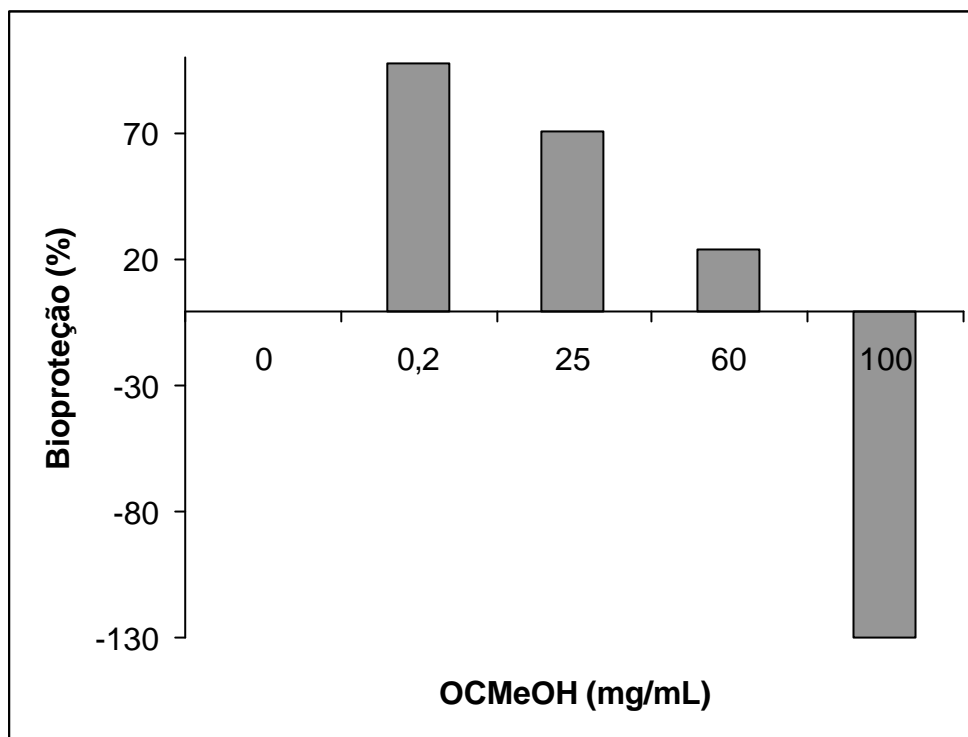


Figura 12. Percentual de bioproteção contra a geração de radicais livres por diferentes concentrações da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). Os resultados representam a média de quatro repetições de ensaios realizados “*in vitro*” onde as diferentes concentrações do extrato vegetal foram adicionadas sobre sistema gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Neste experimento, foi confirmada a ação bioprotetora em doses decrescentes de OCMeOH, onde a concentração de 0,2 mg/mL foi capaz de proteger 98% das membranas quanto à formação de peróxidos de lipídeos e formação de TBARS. A concentração de 100 mg/mL (500 vezes maior) induziu a formação de TBARS adicionais no sistema, que apresentou concentração de radicais livres 1,3 vezes maior que o sistema de experimental utilizado. As concentrações de 25 mg/mL (125 vezes maior) e de 60 mg/mL (300 vezes maior), apresentaram percentual de bioproteção de 71% e 24%, respectivamente. Sugerindo ter ocorrido o efeito farmacológico, comum em plantas com atividade medicinal, denominado de hormese, onde as doses mais baixas de um extrato exercem efeito biológico terapêutico mais pronunciado que as concentrações mais elevadas, que tendem a gerar efeitos tóxicos (Figura 13). O efeito antiparasitário mais expressivo não foi associado à morte celular, mas a alterações morfológicas e desacoplamento das funções enzimáticas-mitocondriais (energéticas), que ocorreram em doses nas quais não foram observadas alterações significativas nas células hospedeira (Figuras 7 e 10). Assim foi possível calcular um índice terapêutico provável para os flavonóides de *O. cuspidata*, que são as estruturas químicas encontradas em maior concentração nos extratos que apresentaram ação antiparasitária para promastigotas de *L. braziliensis*. Para tanto, foram utilizados dois cálculos: o primeiro, levando em consideração que a paralisação metabólica observada nos macrófagos tratados seria um efeito tóxico e o segundo, tomando as alterações morfológicas nos parasitos como parâmetro comparativo. A dose do extrato capaz de paralisar metabolicamente as células hospedeiras foi inferior àquela necessária ao desacoplamento efetivo do metabolismo mitocondrial parasitário (figura 10). De outro modo, a ocorrência de alterações morfológicas originou um índice terapêutico (IT) igual ou superior a 4 (IT=4), tendo-se em conta as

concentrações de extrato capazes de exercer uma ação antiparasitária efetiva para 62% das promastigotas (ED62%) e aquelas capazes de causar alguma alteração morfológica detectável (sinais de apoptose) em 62% (LD62%) dos macrófagos.

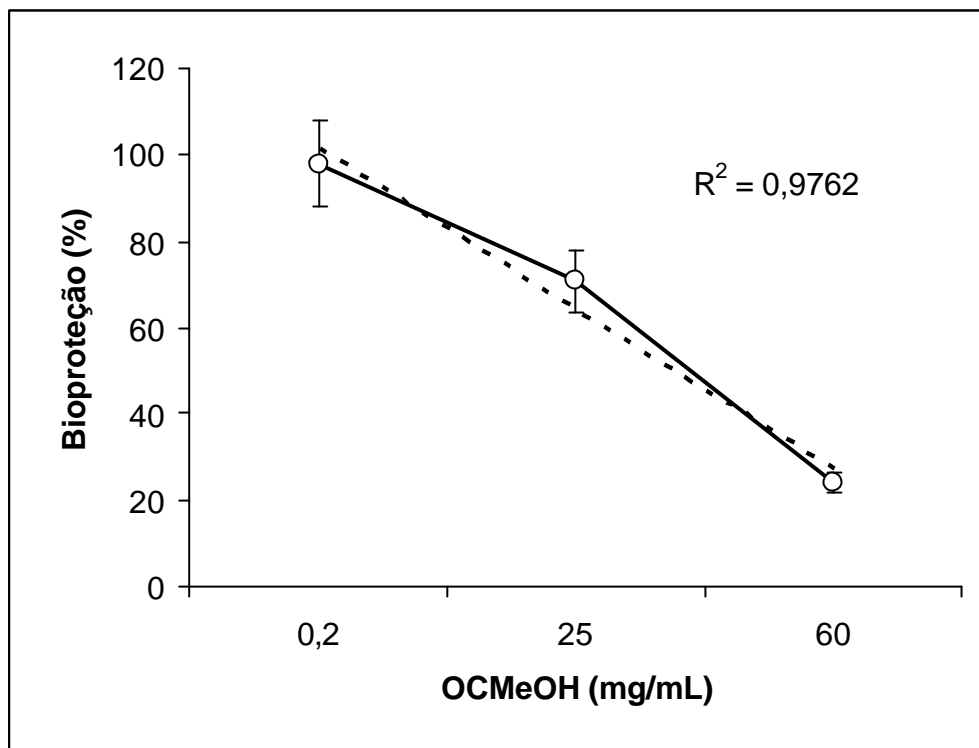


Figura 13. Curva de regressão linear evidenciando a hormese bioprotetora obtida pela adição da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) sobre sistema biológico sujeito à indução de radicais livres reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados estão representados como a média de quatro repetições acrescidos do erro padrão ($p=0,01$).

5 DISCUSSÃO

A leishmaniose é, atualmente, considerada uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta para a Organização Mundial de Saúde (OMS). Esta parasitose afeta cerca de 12 milhões de pessoas no mundo. Estima-se, portanto, que entre 1 e 2 milhões pessoas venham a ser infectadas anualmente, no Brasil e nos países da América Latina (PEARSON & SOUZA, 1996; AZULAY & AZULAY, 1997). Há uma preocupação crescente com o aumento da incidência de casos de leishmaniose clinicamente diagnosticada, por conta de que as diferentes manifestações clínicas da doença deixaram de estar tipicamente restritas a florestas e áreas desmatadas, ocorrendo, também, nas cidades do perímetro urbano (CAMARGO *et al.*, 2003).

O tratamento contra a leishmaniose baseia-se no uso de antimoniais e de anfotericina B. Os principais problemas encontrados no uso destas quimioterapias são os efeitos adversos severos (mialgia, pancreatite, insuficiência renal, neuropatias periféricas, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade) (SABROZA *et al.*, 1992). Além disso, existe um número crescente de pacientes que não respondem mais às drogas devido a problemas de imunossupressão, tais como aquela devida a infecções pelo vírus da imunodeficiência adquirida em humanos (HIV) KARP *et al.* (1996) ou pela resistência decorrente de subdosagens, ou respostas do parasito ao ambiente, em função do desenvolvimento coevolutivo, que ocorre nas espécies parasitárias prevalentes nos ambientes sob constante modificação. Por conta disso, pode-se afirmar que há uma necessidade urgente de se descobrir novos compostos, de menor toxicidade e de custo reduzido em relação aos medicamentos atualmente utilizados.

Atualmente, existem poucos compostos leishmanicidas oriundos de plantas. Infelizmente, nenhum destes se encontra em fase de desenvolvimento, tornando imprescindível que se amplie o número de princípios ativos “candidatos”, que poderão entrar em fase de desenvolvimento de novos fármacos e imunomoduladores, úteis no tratamento e no controle da leishmaniose nos vários níveis em que a doença se manifesta.

Baseados no conhecimento tradicional sobre as propriedades terapêuticas de algumas plantas, desenvolveram-se alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina, entre os quais destacam-se os digitálicos, a quinina, a morfina, a atropina, a aspirina, entre outros (AMORIM *et al.*, 2003; SIMÕES, *et al.*, 2003).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos grupos de substâncias, tais como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos e poliacetilenos, cujas atividades biológicas têm sido estudadas, por conta da sua aplicação popular sob a forma de emplastos, infusos e alcolaturas. Assim, muitas das atividades medicinais atribuídas a extratos brutos vegetais podem ser determinados por compostos que, em função da ocorrência das substâncias com atividade biológica definida, através de interações sinérgicas, aditivas, ou mesmo antagonistas, podem definir atividades que, até pouco tempo, eram desconhecidas (COWAN, 1999; CLARKE *et al.*, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003). Tais substâncias são produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa contra predadores tais como fungos bactérias, parasitos, insetos, moluscos ou mesmo animais superiores (LIMA, 2001; NIERO *et al.*, 2003). As plantas produzem e estocam os produtos do metabolismo secundário em segmentos anatômicos, tornando, assim, a distribuição de substâncias bioativas concentrada nas folhas, caules, raízes, flores ou sementes (MALHEIROS & PERES, 2001).

Recentemente, muitos produtos do metabolismo secundário das plantas tem sido estudados por apresentarem atividades leishmanicida (KAYSER *et al.*, 2000; SAUVAIN *et al.* 1996, BARATA *et al.*, 2000; DELORENZI *et al.*, 2001; TORRES-SANTOS *et al.*, 1999;

CAMACHO *et al.*, 2000). Dentre estas, destacam-se as nafitoquinonas, ligninas, neoligninas, alcalóides, chalconas e triterpenóides. No presente trabalho, procuramos estudar a atividade farmacológica e antiparasitária de uma Ochnaceae, cuja aplicação etnofarmacológica reporta-se à atividade antiinflamatória, antirreumática, hepatoprotetora, antitumoral e, até mesmo, antimalárica (PAULO *et al.*, 1986; ROMING *et al.*,1992; GRYNBERG *et al.*, 1994; GRYNBERG *et al.*, 1998). Selecionamos espécimes de *Ouratea cuspidata*, naturalmente ocorrentes na região costeira da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro (Maricá), dos quais não se tem, até o presente, nenhum estudo biológico realizado. Foram preparados extratos particionados de folhas secas e granuladas de *O. cuspidata*, contendo substâncias de diferentes polaridades em sua composição. Assim, foram obtidas as frações hexânica (OCH), a metanólica (OCMeOH) e de acetato-de-etila (AcEt) que foram utilizadas no presente estudo.

Os extratos e as identificações fitoquímicas dos espécimes de *Ouratea cuspidata* foram feitos pelo doutorando do Curso de Pós Graduação em Química Orgânica , Luciano Ramos Suzart sob a orientação do Professor Mario Geraldo de Carvalho, no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ, que indicou, em sua composição, a ocorrência abundante de flavonóides, bioflavonóides, isoflavonóides, flavonóides glicosídeos, cloro-isoflavonóides, ligninas, ditertenos, triterpenos e esteróides também presentes em outras espécies do gênero *Ouratea* (MOREIRA *et al.*, 1994; FELICIO *et al.*, 1995; VELANDIA,1997; VELANDIA *et al.*, 1998; MBING *et al.*, 2003) (Tabela. 1).

Tabela 1. Grupos químicos de substâncias biologicamente ativas presentes em extratos de diferentes espécies do gênero *Ouratea*

Grupos químicos	Espécie	Referência
Bi-isoflavonóide Isoflavonóide Triterpenos	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al</i> , 1994.
Biflavonas	<i>O. spectabilis</i>	FELICIO <i>et al</i> , 1995.
Triterpenos Esteróides Biflavonóides Flavonóides glicosídeos Cloro-isoflavonóide Nor-isoprenóides Ligninas Diterpenos	<i>O. semiserrata</i>	VELANDIA, 1997, 1998.
Triterpenos	<i>O. floribunda</i>	CARVALHO <i>et al</i> , 2000.
Biflavonóides	<i>O. multiflora</i>	FELÍCIO <i>et al</i> , 2001.
Biflavonóides	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al</i> , 2003.

Os flavonóides são capazes de inibir *in vitro* a peroxidação de lipídeos, a agregação de plaquetas, a permeabilidade capilar e a atividade de enzimas, incluindo ciclo-oxigenases e lipoxigenases. Esses efeitos são devido a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (BRODY, 1994). Nos últimos anos, o interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas destes compostos aumentaram, principalmente pela sua ação antioxidante e antiinflamatória (RIOS, *et al.*, 1974; FORMICA & REGELSON, 1995; HARBONE & WILLIAMS, 2000).

Recentemente, um estudo da atividade antiinflamatória dos flavonóides, atribuiu à ação antioxidante destes, a diminuição da capacidade fagocitária evidenciada em neutrófilos circulantes (KANASHIRO *et al.*, 2004). Nesse caso, os radicais de oxigênio, normalmente

gerados durante o catabolismo respiratório (explosão respiratória), teriam sua produção aumentada nas células fagocíticas normais, que passariam a gerar uma quantidade muito superior de derivados do óxido nítrico ampliando as concentrações normalmente induzidas pelos processos inflamatórios gerais, ou por infecções virais e bacterianas.

Na literatura, são inúmeras as publicações que atribuem aos flavonóides e terpenóides a atividade de bioproteção contra radicais livres. Os terpenóides e compostos esteróides são largamente distribuídos no reino vegetal que exibem, também, efeitos anticonceptivo, antiinflamatório, antimicrobiano e tripanocida (RIOS, *et al.*, 1988; BLOCK *et al.*, 1998 a, b; BRESCIANI, 2003; SARTORI *et al.*, 2003; BRESCIANI *et al.*, 2004). Por conta disso, iniciamos nossas observações pela avaliação do potencial bioprotetor dos extratos de folhas de *O. cuspidata*. Nos ensaios de bioproteção, os diferentes extratos, nas concentrações crescentes de 0, 0,2, 25, 60 e 100mg/mL, foram adicionados sobre um sistema gerador de radicais livres. A atividade bioprotetora foi avaliada de acordo com a eliminação de radicais livres nos sistemas de produção química de substâncias reativas ao ácido-tiobarbitúrico.

Os resultados obtidos indicaram existir uma clara diferença na atividade bioprotetora das preparações testadas. Ficou evidente que a fração OCM_{OH}, em concentrações relativamente baixas (0,2 mg/mL) continha entre seus componentes, substâncias capazes de proteger o sistema biológico, através da diminuição significativa da produção de substâncias oxigênio-reativas, chegando a proteger em 98% as membranas eritrocitárias expostas a geradores de peroxidação lipídica e formação de malondialdeído (MDA) (Figura 5). Nas concentrações de 25 e de 60 mg/mL, entretanto, esta atividade bioprotetora se mostrou progressivamente diminuída, com a detecção respectiva de 71% e 24,4%, sugerindo a existência de antagonistas capazes de diminuir a intensidade do efeito bioprotetor. Na concentração de 100 mg/mL, provavelmente em função do aumento da concentração dessas substâncias, observou-se o aumento da quantidade de radicais livres nos sistemas tratados, indicando ter havido a geração de novos radicais tóxicos em função da adição do extrato ao sistema. Do mesmo modo, os demais extratos avaliados (OCH e OC_{EtAc}) não apresentaram ação inibitória da geração de radicais livres. Ao contrário, foram geradores de radicais tóxicos quando aplicados ao sistema biológico. Tais resultados foram sugestivos de que a fração OCM_{OH} concentra flavonóides e terpenóides que, provavelmente, não se encontram nas outras frações.

Observou-se, também, que macrófagos peritoneais (M ϕ), quando tratados com a fração OCM_{OH}, apresentaram uma forte diminuição na sua capacidade de ingestão de partículas inertes (Zymozan). A drástica diminuição (92%) observada a partir da exposição à concentração de OCM_{OH} equivalente a 16 mg/10⁶ M ϕ /mL, e 98% quando os fagócitos foram expostos à concentração de 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ M ϕ /mL (Figura 6). Esses dados corroboram com aqueles encontrados por Kanashiro *et al.* (2004), no que tange à supressão do potencial fagocítico induzida por flavonóides, gerando resultados diretamente relacionados à diminuição de radicais livres (ação antioxidante), uma vez que nas concentrações testadas o extrato apresentou atividade bioprotetora, inibindo a geração de radicais livres. A inibição do potencial fagocítico em células hospedeiras pode, também, estar relacionada à inibição de monoxigenases independentemente da concentração de radicais livres (LANDOLFIR *et al.*, 1984).

Resultados semelhantes foram obtidos por Torre-Santos *et al.*, (2004) que, estudando extratos de *Pourouma guianensis* (Moraceae) para avaliação da atividade leishmanicida, observaram que os terpenóides presentes causaram inibição da capacidade fagocítica,

dependentemente da concentração de radicais derivados do óxido nítrico. Assim, o efeito imunomodulador, provavelmente também associado à presença de terpenóides, em concentrações capazes de causar a diminuição de derivados oxigênio-reativos (RECIO *et al.*, 1989). Sugere que os flavonóides e terpenóides de *Ouratea* presentes na fração OCMeOH, possam ter atividade anti-fagocitária inversamente relacionada ao aumento na geração de radicais livres.

De maneira similar ao que presentemente foi observado, Torres-Santos *et al.* (2004) avaliaram a atividade leishmanicida de triterpenóides isolados de *Pourouma guianensis* e verificaram que o extrato hexano não demonstrou nenhuma atividade na inibição de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Ambos, os nossos resultados e os resultados obtidos por Torres-Santos *et al.* (2004) apontam para prováveis diferenças na composição dos extratos com atividade anti-parasitária, relacionada com grupos distintos de substâncias bioativas. Assim, as substâncias presentes nas frações hexânicas de plantas com potencial antiparasitário, não exerceriam qualquer efeito sobre a modulação da fagocitose, bioproteção contra radicais livres e ação leishmanicida, mas teriam grande relevância em tratamentos de parasitoses intra-eritrocíticas, tais como na malária onde, aparentemente, seriam mais eficazes. Este indicativo corrobora com os achados de Estevam *et al.* (2005) que verificaram que somente as frações hexânicas de *Ouratea nitida* apresentaram atividade antimalárica, sugerindo que os *Plasmodium* são afetados de maneira distinta dos protozoários do gênero *Leishmania*.

Entre as substâncias os flavonóides e terpenóides presentes no gênero *Ouratea*, destacam-se a friedelina, a antranorina e a amentoflavona (Figura 14) por serem as estruturas mais frequentemente encontradas no gênero. A friedelina (Figura 14-A), quando testada sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (TORRES-SANTOS *et al.*, 2004), não demonstrou atividade inibitória sobre o crescimento parasitário. Camacho *et al.* (2000), similarmente, não detectaram atividade significativamente leishmanicida quando expuseram promastigotas de *L. donovani* a friedelina. No presente estudo, as substâncias presentes na fração metanólica de *O. cuspidata* não apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de formas promastigotas de L566 (Figura 11). As promastigotas expostas ao extrato permanecerem viáveis em todas as concentrações, o que foi aferido pela técnica do azul de Trypan (Figura 7A). A viabilidade dos M ϕ , por sua vez, diminuiu gradativamente a partir da exposição à concentração de OCMeOH equivalente a 8, 16 e 32 mg/10⁶ M ϕ /mL, onde se observou viabilidade de 87%, 78% e 70%, respectivamente, sugerindo existirem substâncias tóxicas não seletivas, não permitindo, assim, uma estimativa do possível índice terapêutico com base na ação parasiticida do extrato OCMeOH. De outro modo, a ação antiparasitária pode ser exercida por alterações metabólicas passíveis de gerar modificações morfológicas importantes, causando proliferação abortiva e interrupção do ciclo biológico parasitário. Os resultados relacionados com as alterações metabólicas foram divergentes, indicando que o extrato possa interferir distintamente no parasito e nas células hospedeiras. Entretanto, o índice terapêutico negativo (inferior a 1) observado, sugere que o extrato possa exercer um efeito imunotóxico em fagócitos. A paralisação metabólica dos macrófagos interrompe a mediação das respostas inflamatórias iniciais, o processamento antigênico, a apresentação de antígenos parasitários e afeta a quimiotaxia necessária para a manutenção da homeostasia celular no sangue circulante dos animais. Além disso, como a paralisação metabólica parece ser exclusiva para fagócitos, é possível que a distribuição dos constituintes presentes no extrato bruto testado possa exercer outros efeitos leucopênicos indesejáveis, com comprometimento dos processos inflamatórios gerais. Uma vez que o parasito pode

compartilhar diversas vias metabólicas com outras células eucarióticas, este efeito citotóxico é criticamente importante, sugerindo cuidados em uma futura aplicação terapêutica ou clínica.

Foram detectadas alterações morfológicas nas promastigotas L566 em todas as concentrações testadas do extrato metanólico, sugerindo que as substâncias presentes no extrato possa interferir na geração de formas parasitárias abortivas (Figura 7B). As promastigotas perderam suas características de forma, tornando-se totalmente redondas, mas ainda com flagelos, o que sugere tratar-se de células defectivas e não de formas amastigotas. Em relação às alterações morfológicas, os M ϕ foram menos afetados que as L566. As alterações foram visualizadas somente em M ϕ tratados com as doses iguais ou superiores a 4mg/10⁶ M ϕ /mL, onde foram observadas lesões celulares típicas de apoptose, com fragmentação nuclear, aparecimento de bolhas citoplasmáticas e fragmentação celular, no processo de morte celular natural ou programada, corroborando com as alterações na permeabilidade celular observadas nos ensaios de viabilidade celular.

A apoptose é um processo natural de morte celular que obedece a um programa pré-determinado de eventos que culminam com a formação de corpos apoptóticos, os quais posteriormente serão fagocitados (SCHWARTZ & OSBORNE, 1995). Tais efeitos são, via de regra associados a alterações do metabolismo mitocondrial da célula afetada.

A mitocôndria é uma organela alvo nas diversas espécies do gênero *Leishmania* de várias substâncias parasiticidas de diversas origens, tais como a pentamidina (CROFT & BRAZIL, 1982; LANGRETH *et al.*, 1983), paramomicina (MAAROUF *et al.*, 1997), licochalcona A (CHEN *et al.*, 1993) e dihidroximetilchalcona (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999).

Vários trabalhos sugerem que diversos produtos de origem vegetal atuam na mitocôndria das formas promastigotas de *Leishmania*, tal como ocorre em tratamentos do parasito com chalconas oxigenadas (ZHAI *et al.*, 1995). Delorenzi *et al.* (2001), também verificaram alterações mitocondriais após a exposição das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* a alcalóides indólicos purificados, obtidos a partir de extratos de *Peschiera australis* (Apocinaceae). Alterações nessa organela foram detectadas em promastigotas de *L. amazonensis* submetidas ao tratamento com chalconas purificadas de *Piper anduncum* (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). O presente estudo, sugere não ter ocorrido alterações da membrana mitocondrial produzidas por inibição do metabolismo enzimático, mas, de maneira contrária, ocorreu uma aceleração metabólica induzida pelo tratamento com OCM_{OH} (Figura 6A). A capacidade de desdobrar o metiltetrazólio (MTT) em cristais de formasana foi aumentada nas concentrações 8mg/10⁶L566/mL, 16mg/10⁶L566/mL e 32mg/10⁶L566/mL, respectivamente.

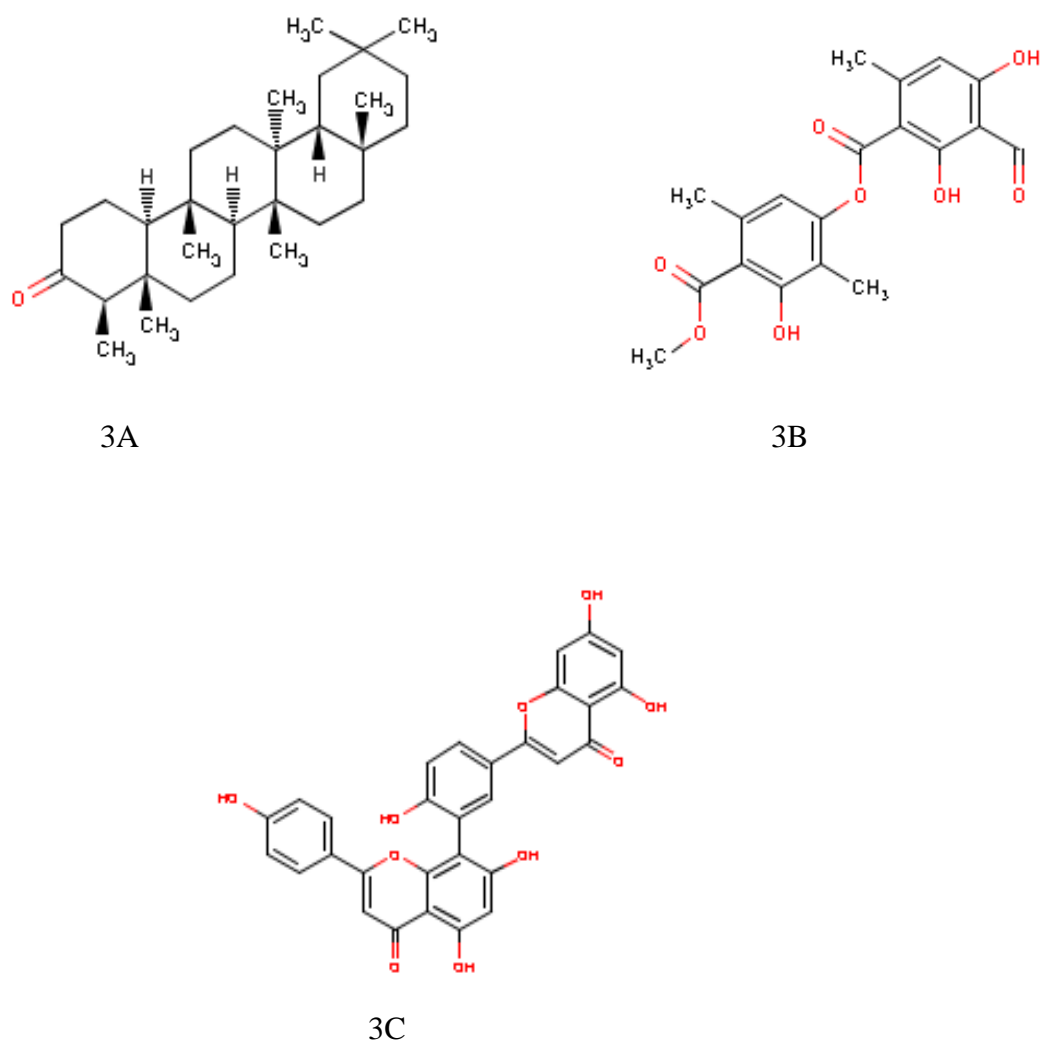


Figura 14. Fórmula estrutural de alguns dos constituintes mais frequentemente identificados em plantas do Gênero *Ouratea*: 3A – Friedelina, 3B- Antranorina e 3C - Amentoflavona. Os grupamentos químicos reacionais estão destacados em vermelho.

O aumento na atividade metabólica mitocondrial evidenciado nas promastigotas que foi aumentada nas concentrações 8, 16, 32 mg de OCM₂OH/10⁶ L566/mL em 220%, 389% e 480%, respectivamente, quando comparadas ao controle L566 apresentou correlação direta com o aumento das taxas de proliferação celular observado nas avaliações do crescimento de promastigotas frente às mesmas concentrações de OCM₂OH (Figura 11).

Embora a presença constante de antranorina (Figura 14B) nos extratos de plantas do gênero *Ouratea*, também seja sugestiva, pode-se afirmar que não houve participação desta substância nos efeitos observados. A antranorina (3-Hidroxi-4-(metoxicarbonil)-2,5-dimetilfenil-3-formil-2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato) é o principal constituinte do gênero que, a despeito de seu potencial alergênico (tóxico), apresenta atividades antimicrobianas, atua na síntese macromolecular, interfere na cadeia respiratória, desacoplando a transferência de elétrons e interferindo na fosforilação oxidativa celular (SANDBERG & THUNE, 1990). Esta

substância expressa sua atividade imunorregulatória através de sua intensa atividade alergênica, provocando alergia respiratória, fotossensibilização e dermatite de contato que, ocorre em minutos após a exposição ao extrato. Ocorre, nesse caso, a liberação de histamina com conseqüente contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular (edema). Os sintomas mais comuns de reações tóxicas induzidas pela antranorina são vermelhidão, inchaço, calor e dor no local de aplicação. De outro modo, uma vez que sua atuação sobre a fosforilação oxidativa decorre de sua intensa lipossolubilidade, que a predispõe para a passagem através da membrana mitocondrial interna, onde seqüestra prótons, gera radicais livres e inibe a ATPase. Sua presença na fração metanólica, portanto, deve ser descartada. Sua ausência na fração OCMeOH foi confirmada através de análises fitoquímicas dos extratos testados, o que também justifica a não interferência dessas preparações vegetais sobre a inibição da atividade mitocondrial parasitária.

As alterações morfológicas observadas nas promastigotas de L566 tratadas com OCMeOH caracterizaram-se pela presença de diversas células com mitose incompleta, decorrente da não separação entre promastigotas durante a fase de multiplicação por fissão binária, e pela presença de formas promastigotas com dois flagelos, sugerindo uma possível interferência sobre as topoisomerases parasitárias. Tais efeitos podem decorrer da interferência de bi-flavonóides (Figura 14C) que apresentam potencial ação antiinflamatória, antitumoral e antiparasitária (SUZUKI *et al*, 1999; GRYNBERG *et al.*, 2002). Estas substâncias são bis-apigeninas que atuam nos canais de Cálcio, aumentando sua liberação, inibindo as caspases (inibem a apoptose e a necrose), sendo, portanto, bioprotetoras, mitogênicas, antiulcerogênicas, antiinflamatórias (inibidoras específicas da ciclooxigenase COX2), inibidoras da fosfolipase A2, antiofídicas, antiazepínicas (calmantes) e inibidoras das monooxigenases relacionadas a xenobióticos aromáticos cancerígenos (anticancerígenas).

Embora uma planta possa conter uma variedade de metabólitos secundário, apenas compostos em maiores concentrações são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica. A análise de substâncias ativas é muito complexa e longa, já que compostos presentes em menores quantidades na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO & YUNES, 2001; MALHEIROS & PERES, 2001).

No presente ensaio se pôde notar uma intensa atividade biológica associada aos efeitos atribuídos a bis-apigeninas (flavonóides), com marcante efeito sobre a proliferação parasitária e concomitante efeito antiinflamatório decorrente da paralisação metabólica nas células hospedeiras. Nesse contexto, a atividade antiparasitária exercida pelos constituintes presentes no extrato OCMeOH estariam relacionados à inibição da fagocitose dos parasitas que, por não penetrarem ativamente nas células do hospedeiro, estariam mais expostos aos efeitos locais da droga sobre as topoisomerases parasitárias, levando à formação de formas defectivas, não infectantes que teriam sua proliferação no local de infecção comprometida.

O cálculo do potencial terapêutico, tendo como base o aparecimento de alterações morfológicas importantes evidenciou um índice terapêutico positivo (IT=4). Este resultado é indicativo do potencial antiparasitário dos flavonóides presentes em *O. cuspidata* e carece de estudos mais aprofundados afim de que sejam identificados futuros fármacos a serem empregados na terapêutica e(ou) controle da LTA.

Do mesmo modo, a ação imunotóxica, observada em Mφ expostos às doses mais elevadas, pode estar relacionada aos efeitos decorrentes da ação de bis-flavonóides sobre as ciclo-oxigenases dos fagócitos do hospedeiro. Esta possibilidade parece ser a mais plausível,

uma vez que o fenômeno de hormese (Figura 13), evidenciado pela bioproteção ocorrida nas células hospedeiras expostas às menores doses do extrato vegetal (Figura 12), são característica deste grupo de substâncias com atividades medicinais (KLAASEN & WATKINS III, 2003).

A ação inibitória específica para as ciclooxigenases COX2 é bastante comum em plantas medicinais que apresentam atividade anti-inflamatória (HAYES, 2001). Os medicamentos conhecidos como anti-inflamatórios, os quais são, na maioria das vezes antipiréticos e analgésicos, são divididos em dois grandes grupos: os derivados da cortizona (corticoides, ou esteroides) e anti-inflamatórios não hormonais.

O principal mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais ocorre pela inibição de um sistema enzimático denominado de ciclo-oxigenase (COX), responsável pela síntese dos diferentes tipos de prostaglandinas (PG). Existem duas isoformas de COX, denominadas COX1 e COX2, respectivamente. A inibição da COX1 seria responsável por efeitos colaterais relacionados à hemorragia gástrica e irritação das mucosas. Este problema tornou necessária a busca de novas substâncias capazes de regular a COX2, que seria a isoforma responsável pela geração de PG que combateria especificamente a inflamação. Assim, os inibidores seletivos de COX2 seriam capazes de evitar os efeitos tóxicos decorrentes da ação de inibidores não seletivos, ou específicos para COX1. Nos rins a COX 2 regula a excreção de sais pela renina, o volume circulante e a homeostasia da pressão arterial, mas inibem significativamente a formação de prostaciclina, afetando a produção de plaquetas circulantes, podendo predispor ao indivíduo susceptível (idosos e cardíacos) a eventos trombóticos, ou definindo quadros de hipertensão arterial. Em fêmeas, a inibição da COX2 pode afetar a ciclagem hormonal, causando amenorréias secundárias e afetando a fertilidade. A OMS, considerando os riscos de acidente vascular cerebral, trombose e enfarte obstrutivo do miocárdio pelo uso indiscriminado de preparações vegetais brutas contendo inibidores seletivos da COX2, sugeriu que se evitasse sua utilização sob a forma de produtos terapêuticos para uso interno (HAYES, 2001, KLAASSEN & WATKINS III, 2003).

Assim, é dada a preferência para o uso terapêutico de inibidores não seletivos, de baixa toxicidade, tais como a Aspirina, o Ibuprofen, o Naproxen, o Paracetamol, o Diclofenac, a Indometacina e o Piroxican. Uma vez que os bi-flavonóides presentes no extrato metanólico de *O. cuspidata* estão entre os inibidores seletivos de COX2, sua utilização sob a forma de preparação tópica em tratamentos da Leishmaniose Tegumentar Americana seria a mais recomendada.

Desta forma, os resultados presentemente obtidos são indicativos de que os flavonóides de *O. cuspidata* apresentam atividade anti-*L. braziliensis* e anti-fagocitária que, combinadas, os torna a base para o desenvolvimento de novos fármacos candidatos a aplicação medicinal nas formas clínicas de LTA.

6 CONCLUSÕES

Com base na interpretação dos resultados presentemente obtidos, conclui-se que:

1. A fração metanólica oriunda de folhas de *Ouratea cuspidata* apresenta propriedades biológicas que a indicam como potencialmente ativa para tratamento tópico das manifestações cutâneas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
2. Foi possível determinar que a fração metanólica de folhas de *O. cuspidata* possui atividade biológica atribuída às substâncias bioprotetoras do grupo dos flavonóides (bis-apigeninas), presentes em grandes concentrações, capaz de eliminar radicais livres quando utilizada em baixa concentração.
3. A atividade antiparasitária dos extratos de *O. cuspidata* é aumentada pela supressão da fagocitose por fagócitos do hospedeiro que, juntamente com a indução de formas parasitárias defectivas, interrompe o ciclo biológico parasitário no local de infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; ESLAMI, M. B.; KEMP, K. & KHARAZMI, A. 2000. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and Immunity*, **68**:1760-1764.
- AMARAL, M. C. E. 1991. Phylogenetische Systematik der Ochnaceae. *Botanische Jahrbucher fur Systematik*, **113**: 105-196.
- AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A., HIGINO, J. S., SILVA, L. R. S. & ALBUQUERQUE, U. P. 2003. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. *Infarma*, **15**: 66-69.
- ASHFORD, R. W., DESJEUX, P. & DERAADT, R. P., 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, **8**: 103-104.
- ASHFORD, R. W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1269-1281.
- AZULAY, R. D. & AZULAY, D. R. 1997. Dermatoses por protozoários. In: *Dermatologia* (2nd ed.), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 224-233.
- BARRETT, M. P., MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. 1999. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmaniasis. *Trends in Microbiology*, **7**: 82-88.
- BARATA, L. E. S., SANTOS, L. S., FERRI, P. H., PHILLIPSON, J. D., PAINE, A. & CROFT, S. L. 2000. Ant-leishmanial activity of neolignans from *Viola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*, **55**: 589-595.
- BERG, K., ZHAI, L., KHARAZMI, A. & OWEN, T. C. 1994. The use of a water-soluble formazan-complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitology Research*, **80**: 235-239.
- BERMAN, J. D. 1997. Human Leishmaniasis: Clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical and Infectious Diseases*, **24**: 684-703.
- BLOCK, L. C.; SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A.; SOUZA, M. M.; DELLE MONCHE, F. & CECHINEL FILHO, V. 1998a. Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paudosa*. *Journal Ethnopharmacology*, **61**: 85-89.
- BLOCK, L. C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N. L. M.; SANTOS, A. R. S. & CECHINEL FILHO, V. 1998b. Phytochemical and pharmacological analyses of different parts of *Wedelia paudosa* D.C. (Compositae). *Pharmazie*, **53**: 716-718.
- BRAY RS. 1985. *Immunodiagnosis of leishmaniasis*. In: Chang KP, Bray RS (eds) *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers B.V. Biomedicine Division p.177-182

BRESCIANI, L. F. V. 2003. Análise quantitativa dos princípios ativos de algumas plantas medicinais da flora catarinense. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, SC.

BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A. & CECHINEL-FILHO, V. 2004. Seasonal variation of kaurenoic acid *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*). *Zur Naturforsch.*, **59**: 229-232.

BRODY, T. 1994. *Nutritional biochemistry*. Academic Press, San Diego, 658p.

CARLINI, E. A. 1983. Pesquisas com plantas brasileiras usadas em medicina popular. *Revista Associação Médica Brasileira*, **29**: 109-110.

CAMACHO, M. D., MATA, R., CASTANEDA, P., KIRBY, G. C., WARHURST, D. C., CROFT, S. L. & PHILLIPSON, J. D. 2000. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Médica*, **66**: 463-468.

CAMACHO, M. D., PHILLIPSON, J. D., CROFT, S. L., ROCK, P., MARSHALL, S. J. & SCHIFF Jr., P. L. 2002. *In vitro* activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research*, **16**: 432-436.

CAMARGO, L. M. A., BARCINSKI, M. A. 2003. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*, **1**: 34-37.

CARVALHO, M. G. de., CARVALHO, G. J. A. de. & BRAZ-FILHO, R. 2000. Chemical Constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of Atranorin and its New Acetyl Derivative. *Journal Brazilian Chemical Society*, **11**:143-147.

CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. 1998. estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, **21**: 99-105.

CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. 2001. Estudos químicos de plantas medicinais orientado para análise biológica, obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A, CALIXTO, J. B. *Plantas medicinas sob. a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 47-75.

CHATURVEDI, A. K., PARMAR, S. S., BHATNAGAR, S. C., MISRA, G., NIGAM, S. K. 1974. Anticonvulsant and anti-inflammatory activity of natural plant coumarins and triterpenoids. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **9**: 11-22.

CHEN, M., S. B. CHRISTENSEN, J., BLOM, E., LEMMICH, L., NADELMANN, K., FICH, T. G., THEANDER, A. & KHARAZMI. 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 2550-2556.

CLARKE, J. M., GILLENES, M. R., ALTAVILLA, N. & BEALE, A. J. 2001. Testing natural products for antimicrobial activity-potencial problems with fluorescein diacetate assays of cell viability. *Journal Microbial. Rev.*, **16**: 261.

CORREIA, M. P. 1975. Dicionário das Plantas Úteis no Brasil. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro(GB), p386.

COWAN, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 564-582.

CROFT S. L. & BRAZIL R. P. 1982. Effect of pentamidine isothionate on ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **76**:37-43

DELORENZI, J. C., ATTIAS, M., GATTASS, C. R., ANDRADE, M., REZENDE, C., PINTO, A. D., HENRIQUES, A. T., BOPU-HABIB, D C. & SARAIVA, E. M. B. 2001. Antileishmanial activity of na índole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1349-1354.

DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. & CHATTERJEE, M. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, **54**: 119-122.

ESTEVAM, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. F. C. O.; BARROS, E. C. P.; BARROS, A. C. P.; ROCHA, E. M. M. & ANDRADE, E. H. A. 2005. Constituintes químicos e avaliação preliminar in vivo da atividade antimalárica de *Ouratea nítida* Aubl (Ochnaceae). *Revista Brasileira de Farmacologia*, **15**: 195-198.

FAY, M. F., SWENSEN, S. M. & CHASE, M. W. 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bull*, **52**: 111-120.

FELICIO, J. D., GONÇALEZ, E., BRAGGIO, M. M., CONSTANTINO, L., ALBASINI, A. & LINS, A. P. 1995. Inhibition of lens Aldose Reductase by Biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Medica*, **61**:217-220.

FELICIO, J. D., ROSSI, M.H., HUI, R.P., GONÇALEZ, E., BRAGGIO, M. M., DAVID, J.M. & CORDEIRO, I. 2001. Biflavonoids from *Ouratea multiflora*. *Fitoterapia*, **72**: 453-455.

FORMICA, J. V. & REGELSON, W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, **33**: 1061-1080.

GIL, L. H. S., BASANO, S. A., SOUZA, A. A., SILVA, M. G. S., BARATA, I., ISHIKAWA, E. A., CAMARGO, L. M. A. 2003. Recent observations on the sand fly (Diptera:Psychodidae) fauna of the sate of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**: 751-755.

GREVELINK S. A. & LERNER, E. A. 1996. Leishmaniasis. *Journal of American Academy of Dermatology*, **34**: 257-272.

GRYNBERG, N. F., MORTORELLI, R. A., CARVALHO, M. G. de, BRAZ-FILHO, R., MOREIRA, I. C., SANTOS, A. C. S. & ECHEVARRIA, A. 1994. *Proceedings of the XVI International Cancer Congress*, Monduzzi ed., Bologna, p63.

GRYNBERG, N. F., BRIOSO, P. S. T., VELANDIA, J. R., ECHEVARRIA, A. CARVALHO, M. G. de, BRAZ-FILHO, R. 1998. *Proceedings of the XVII International Cancer Congress*, Monduzzi ed., Bologna, p317.

GRYNBERG, N. F., CARVALHO, M. G., VELANDIA, J. R., OLIVEIRA, M. C., MOREIRA, I. C., BRAZ-FILHO, R. & ECHEVARRIA, A. 2002. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **35**: 819-822.

HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**: 481-504.

HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**: 3864-3874.

HAYES, A. W. 2001. *Principles and methods of Toxicology*. 4ed. Taylor & Francis. 1835p.

HERSCOWITZ, H. B.; HOLDEN, H. T.; BELLANTI, J. A.; GHAFFAR, A. 1981. Manual of Macrophage Methodology Collection, Characterization, an Function. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 531p.

HERZORG-SOARES, J. D. A. & FREIRE, R. B. 2004. Effect of Citrinin and in Association with Aflatoxin B₁ on the Infectivity and Proliferation of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *The Brazilian Journal of Infection Diseases*, **8**:101-108.

HEYWOOD, V. H. 1978. In *Flowering Plants of the World*; Oxford University Press, London, p.82.

HOEHNE, F. C. 1978. *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais*. Departamento de botânica.

JENSEN, J. B. 1983. In Vitro cultivation of protozoan Parasites. CRC Press. 297p.

JOLY, A. B. 1998. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 777p.

KANASHIRO, A. ; KABEYA, L. M. ; POLIZELLO, A. C. M. 2004.. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes . *Phytotherapy Research*, **18**: 61-65.

KARP, C. L., WYSOCKA, M., WAHL, L. M., AHEARN, J. M., CUOMO, P. J., SHERRY, B., TRINCHIERI, G. & GRIFFIN, D. E. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science*, **273**: 228-231.

KAYSER, O., KIDERLEN, A. F., LAATSCH, H. & CROFT, S. L. 2000. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropical*, **76**: 131-138.

KLAASSEN, C. D. & WATKINS III, J. B. 2003. *Casarett and doull's Essentials of Toxicology*. Chapter 2. Editora: The McGraw-Hill Companies, Inc.533p.

KOROLKOVAS, A. 1988. *Essencial of medicinal of chemistry*. 2.ed, New York: John Wiley & Sons, 1204p.

LANGRETH, S. G.; BERMAN, J. D.; RIORDAN, G. P. & LEE L. S. 1983. Fine-structural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs *in vitro*. *Journal of Protozoology*, **30**:555-561

LAINSON, R. & SHAW, J. J. 1979. *The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis*. Lumsden WHR & Evans D. *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, **1**:1-120.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol 1 Biology and Epigemiology* Petter, W and Killick-Kendrick, R. (Eds.) Academic Press.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1988. *New world Leishmaniasis – The Neotropical Leishmania species*. In: Topley & Wilson. *Microbiology and Microbial Infections* (9a ed.). London: Ed. Feg Cox.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. 1992. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to *Amazonian Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, **44**:94-106.

LAINSON, R. 1997. *Leishmania e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil*. *Revista Paraense de Medicina*, **11**: 29-40.

LANDOLFIR, R., MOWER, R. L. & STEINER, M. 1984. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochemical Pharmacology*, **33**: 1525-1530.

LENNETE, E. H. & SCHIMIDT. 1979. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Cllamydial Infctions*. American Public Health Association, Inc. Ed. 1138pp.

LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, F. E. G., DEROUX, G., GRAIN, J., RONIGBERG, B. M., LIEEDALE, G. F., LEOEBLICH, A. R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E. G., PAGE, F. C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VÁVRA, J. & WALLACE, F. G. 1980. A newly revised classification of the PROTOZOA. *Journal of Protozoology*, **27**: 37-58.

LIMA, E. O. 2001. Plantas e suas propriedades antimicrobianas; uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A, CALIXTO, J. B. *Plantas medicians sob. a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 479-499.

MAAROUF, M., Y.; DE KOUCHKOVSKY, S.; BROWN, P. X.; PETIT, M & ROBERT-GERO. 1997. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, **232**:339-348

MACIEL, M. A., PINTO, A C., VEIGA JR, V. F., GRYNBERG, N. F. & ECHEVARRIA, A. 2002. Planta Medicinai: A necessidade de Estudos Multidiciplinares. *Química Nova*, **3**: 429-438.

MALHEIRO, A. & PERES, M. T. L. P. 2001. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A, CALIXTO, J. B. *Plantas medicinas sob. a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 504-523..

MARZOCHI, M. C. A. & MARSDEN, P. P. 1991. Ecologia e Controle de Vetores-Leishmanioses. In: *Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz)*, Rio de Janeiro: pp. 31-36.

MARZOCHI, M. C. A. 1992. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). *Jornal Brasileiro de Medicina*, **63**: 81-105.

MARZOCHI, M. C. A., MARZOCHI, K. B. F. & CARVALHO, R. W. 1994. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*, **10**: 37-40.

MBING, J. N., PEGNYEMB, D. E., TIH, R. G., SONDEGAM, B. L., BLOND, A. & BODO, B. 2003. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. *Phytochemistry*, **63**: 427-431.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (MSB). 2000. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília.

MONTENEGRO, J. 1926. Cutaneous reactions in leishmaniasis.. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 13:187

MONTEIRO, C.; MANTA, C.; JUSTINO, F.; TAVARES, R.; CURTO, M. J. M.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M. S. J. & PINYO, M. 2004. Hemisynthetic Secofriedelane triterpenes with Inhibitory Activity against the Growth of Human Tumor Cell Lines in Vitro. *Journal of Natural Products*, **67**: 1193-1196.

MOREIRA, I. C., SOBRINHO, D. C., CARVALHO, M. G. DE & BRAZ-FILHO, R. 1994. Isoflavanone dimers hexaspermone A, Band C from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, **35**: 1567-1572.

MOREIRA, I. C, CARVALHO, M. G. DE, BASTOS, A. B. F. O. & BRAZ-FILHO, R. 1999. Flavone dimmer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, **51**: 833-838.

NEVES, D. P. 2003. *Parasitologia Humana*. 10ed. São Paulo: Atheneu, 428p.

NIERO, R., MALHEIROS, A., BITTERN COURT, C. M. S., BIAVATTI, M. W., LEITE, S. N. & CECHINEL FILHO, V. 2003. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B. & CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: Editora UNIVAL, 239p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003. *Epidemiology and control of leishmaniasis*. Technical Report Series. Genva: WHO.

- PAULO, M. Q.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F. & XAVIER FILHO, L. 1986. Antimicrobial activity of the fruit of *Ouratea parciflora* Baill (Ochnaceae). *Chin Chiao I Sheng Tsa Chin*, **83**: 19-21.
- PARAGUASSU-CHAVES, C.A. 2001. *Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental)*. Rondônia: Edufro.
- PATZ, J. A., GRACZYK, T. K., GELLER, N. & VITTOR, A. Y. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal Parasitology* **30**: 1395-1405.
- PEARSON, R. D. & SOUSA, A. Q. 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical and Infectious Diseases*, **22**: 1-13.
- PESSÔA, S. M. 1982. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- PESSOA, S. D & BARRETO, M. P. 1994. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Rio de Janeiro: Serviço de documentação, Ministério da Educação e Saúde.
- PIMENTA, P. F. P., TURCO, S. J., MCCONVILLE, M. H., LAWYER, P. G., PERKINS, P. V. & SACKS, D. L. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**: 1812-1815.
- QUEIROGA, C. L., SILVA, G. F., DIAS, P. C., POSSENTI, A. & de CARVALHO, J. E. 2000. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and fridelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **72**: 465-468.
- REBÊLO, J. M. M. (b). 1999. Flebótomos vetores das leishmanioses (*Manual para técnicos e profissionais de Saúde*) São Luís: Universidade Federal do Maranhão/ Ministério da Saúde.
- RECIO, M. C.; RIOS, J. L. & VILLAR, A. 1989. A Review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature between 1978-1988. *Phytotherapy Research*, **3**: 117-125.
- REY, L. 1991. *Parasitologia*. 2ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S. A. 731pp.
- RIOS, J. L., MAÑEZ, S., PAYA, M. & ALCARAZ, M. J. 1974. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, **31**: 1947-1950.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C. & VILLAR, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacol.* **23**: 127-149.
- ROMING, T. L., WEBER, N. D., MURRAY, B. K., NORTH, J. A., WOOD, S. G., HUGHES, B. G. & CATES, R. G. 1992. Antiviral activity of Panamanian plant extracts. *Phytotherapy Research*, **6**: 38-43.
- SABROZA, P.C., BRAY, M. P. BARRETT, S. A. WARD & KONING H. P. 1992. Pentamidine Uptake And resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. *Trends in Parasitology*, **19**: 232-239.

SANDBERG, M. & THUNE, P. 1990. The sensitizing capacity of antranorin. *Contact Dermatitis*, **11**, 168-173.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; CRUZ, A. B.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A. & CECHINEL FILHO, V. 2003. Antifungal activity of compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE). *Pharmazil*, **58**:567-569.

SAUVAIN, M., KUNESCH, N., POISSON, J., GANTIER, J. C., GAYRAL, P. & DEDET, J. P. 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytotherapy Research*, **10**: 1-4.

SCHWARTZ, L. M. & OSBORNE, B. A. 1995. *Cell death*. Academic press. 459pp.

SACKS, D. L. 1992. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infectious Agents and Disease*, **1**: 200-205.

SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., BRITO, A.C., OLIVEIRA, M.R.F., PAES, M. G., SOUZA, A. A. A. & SILVA, B. M. 1997. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão R.N.Q. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora CEJUP.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G. MELLO, J. C. P., MENTAZ, L. A. & PETROVICK, P. R. 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. 1102p.

SIXEL, P. J. 1998. O resgate das plantas medicinais e fitoterapia. *Revista Centro de Ciências Médicas da UFF*, **2**: 49-54.

SOUZA, M. M., BELLA CRUZ, A. SCHUMACHER, M. B., KRUEGER, M. R. O., FREITAS, R. A. & BELLA CRUZ, R. C. 2003. Métodos de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. & CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: Editora UNIVAL, 239p.

SUZUKI, A., MATSUNAGA, K., MIMAKI, Y., SASHIDA, Y. & OHIZUMI, Y. 1999. Properties of amentoflavone, a potent caffeine-like Ca²⁺ releaser in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *European Journal of Pharmacology*, **372**, 97-102.

TORRES-SANTOS, E. C., MOREIRA, D. L., KAPLAN, M. A. C. MEIRELLES, M. N. & ROSSI-BERGMANN, B. 1999. Selective effect of 2',6'-di-hydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncun* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents chemother*, **43**: 1234-1241.

TORRES-SANTOS, E. C., LOPES, D., RODRIGUES OLIVEIRA, R., CARAUTA, J. P. P., BANDEIRA FALCÃO, C. A., KAPLAN, M. A. C. & ROSSI-BERGMANN, B. 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, **11**: 114-120.

TURK, H., YILMAZ, M., TAY, T. TURK, A. O. & KIVANC, M. 2006. Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their

physodic acid, chloroatranorin, atranorin and olivetoric acid constituents. *Zur Naturforsch*, **61**: 499-507.

UCHÔA, C. M. A., SERRA, C. M. B.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.; SILVA, C. M. M. THEOPHILO, F.; FIGLIUOLO, L. P.; HORTA, F. T & MADEIRA, M. F. 2001 Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **34**: 563-568.

UGAZ, O. L. 1994. *Investigación Fitoquímica. Métodos em el estudio de Productos Naturales* 2ªed. Pontificia. Universidad Católica Del Peru, cap 2.

VASILEVA, B. 1969. *Plantas Medicinaias de Guine*; Conakry, República De Guine, Moscow, Universidade Moscow-USSK.

VELANDIA, J. M. 1997. *Constituintes químicos de Ouratea semiserrata e transformações químicas da neolignana aureina*, Tese de Doutorado; CPGQO- Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

VELANDIA, J. M., CARVALHO, M. G. DE & BRAZ-FILHO, R. 1998. Ácido ent-16a, 17-diidroxicauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. *Química Nova*, **21**:397-404.

WILSON, M. E. 1993. Leishmaniasis. *Current Opinion in infectious Diseases*, **6**: 331-341.

WOLDAY, D., BERHE, N., AKUFFO, H. & BRITTON, S. 1997. Leishmania-HIV interaction: Immunopathogenic mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 182-187.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1990. Control of leishmaniasis: Report of WHO expert committee. *Technical report series* 793. Geneva.

ZHAI, L., BLOM, J., CHEN, M., CHRISTENSEN, S. B. & KHARAZMI, A. 1995. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 2742-8.