

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MISLEIA RODRIGUES DE AGUIAR GOMES**

**Investigação fitoquímica e da atividade da espécie do Cerrado *Enterolobium ellipticum* Benth (Fabaceae) em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Trichophyton spp.***

**BRASILIA, 2014**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MISLEIA RODRIGUES DE AGUIAR GOMES**

**Investigação fitoquímica e da atividade da espécie do Cerrado *Enterolobium ellipticum* Benth (Fabaceae) em *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Trichophyton spp.***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espindola  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Carneiro Albernaz

**BRASILIA, 2014**

## MISLEIA RODRIGUES DE AGUIAR GOMES

Investigação fitoquímica e da atividade da espécie do Cerrado *Enterolobium ellipticum* Benth (Fabaceae) em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Trichophyton spp.*

### BANCA EXAMINADORA

---

Professora Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araujo

(Presidente)

---

Professor Dr. Jose Realino de Paula

(Membro)

---

Professor Dr. Rodrigo Gurgel

(Membro)

*Aos meus pais João Paulo e Noeme.*

## AGRADECIMENTO

A Deus por ter me dado o dom da vida. Toda a honra e gloria seja a dada a Ti Senhor pela sua misericórdia na minha vida.

A orientadora Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espindola por ter aceitado me orientar, pela confiança e pelas oportunidades dadas.

A co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Lorena Albernaz Carneiro, que foi uma pessoa maravilhosa, pela sua compreensão, sabedoria e dedicação me guiando e me ensinando, proporcionando assim, meu crescimento pessoal e profissional.

A minha família, principalmente meus pais por todo o apoio, ensinamentos, incentivo e compreensão neste período de aprendizado e em toda minha vida.

Aos meus amigos do laboratório de microscopia eletrônica (Universidade de Brasília) por dividirem comigo os desafios, as barreiras, as alegrias e as tristezas vividas neste aprendizado.

Aos alunos, estagiários e professores do laboratório de farmacognosia, especialmente a Renata pela ajuda direta no meu trabalho e por tudo que fez por mim na Grécia.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula *in memoriam* (Universidade de Brasília), pela identificação do *Enterolobium ellipticum*.

A Profa. Sabrina (Université Paris V), pelo auxílio no fracionamento químico do *Enterolobium ellipticum*.

Aos professores Leandros Skaltsounis e Maria Halabalaki (National and Kapodistrian University of Athens), pelo suporte do seu laboratório e por contribuir de forma importante à nossa pesquisa.

Aos doutorandos Job, George e Alexandra (National and Kapodistrian University of Athens), pela ajuda na identificação dos compostos isolados. ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΤΟΥΣ ΦΙΛΟΥΣ.

Ao professor e amigo Dr. José Raimundo Corrêa (Universidade de Brasília), por todo o auxílio tanto com as ideias na parte biológica do meu trabalho, quanto com o suporte do laboratório de microscopia eletrônica. Serei eternamente grata.

A minha companheira de jornada Núbia por toda ajuda e principalmente pela paciência comigo.

Ao Projeto FP-7/”ChemBioFight” pela oportunidade de ter feito parte do trabalho em Atenas.

Ao prof. Gustavo Romero (Universidade de Brasília) por ter cedido o laboratório de leishmaniose para obtenção das amastigotas axênicas.

Agradeço à CAPES, CNPq e a FAPDF pelo suporte financeiro ao Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana e as dermatofitoses são doenças que provocam lesões cutâneas. Os medicamentos disponíveis para o tratamento das doenças apresentam efeitos adversos, por isso a necessidade de uma busca por novos compostos mais específicos para o tratamento da doença. Neste estudo, foi testado a atividade antifúngica e leishmanicida do extrato da casca do caule de *Enterolobium ellipticum* e de seus compostos isolados. O fracionamento do extrato por cromatografia em coluna aberta permitiu o isolamento e identificação de terpenos, flavonoides e um hidrocarboneto. Foram identificados os triterpenos lupenona, taraxasterol e ácido betulínico, os flavonoides catequina e dímero de catequina e o hidrocarboneto 9-hexacoseno relatados pela primeira vez para a espécie *Enterolobium ellipticum*. A catequina apresentou atividade fungicida com um CIM de 125 µg/mL em *T. mentagrophytes* ATCC 9533. O extrato bruto e a catequina apresentaram uma considerada atividade de inibição da proliferação das formas promastigostas da *Leishmania amazonensis*. O extrato foi citotóxico em macrófagos murinos e a catequina apresentou uma citotoxicidade moderada. Os ensaios de infectividade em macrófagos murinos e a extrato bruto de *Enterolobium ellipticum* diminuiu a infectividade dos parasitos intracelulares com a infecção já em curso, e também quando aplicado ao pré-tratamento, sugerindo que o extrato intensifica os mecanismos microbicidas dos macrófagos, levando à morte da *Leishmania*. Enquanto a catequina foi eficiente somente na diminuição dos parasitos no tratamento com a infecção já em curso. O efeito leishmanicida do extrato e da catequina foi confirmado com a análise morfológica onde foi observado o efeito sobre a membrana celular do parasito e presença de poros. Estes resultados permitem concluir que a catequina é um dos princípios ativos do extrato de *E. ellipticum* e que estudos futuros são necessários para avaliação dos efeitos *in vivo*.

Palavras-chave: *Enterolobium ellipticum*, Cerrado, *Leishmania amazonensis*, fungos dermatófitos.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis and dermatophytosis are diseases that cause cutaneous lesions available drugs have adverse effects, so the need for a more specific search for new compounds for treating disease. This study tested the antifungal activity and leishmanicide stem bark extract of ellipticum *Enterolobium* and their isolated compounds. The extract fractionation by open column chromatography allowed the isolation and identification of terpenes, flavonoids and a hydrocarbon. The lupenona triterpenes, taraxasterol and betulinic acid, flavonoid catechin and catechin dimer and the 9-hexacosene hydrocarbon reported first time to *Enterolobium ellipticum* species. The catechin showed antifungal activity with a MIC of 125 mg / mL in *T. mentagrophytes* ATCC 9533. The crude extract and catechin showed an activity considered inhibition of proliferation of promastigostas forms of *L. amazonensis*. The extract was cytotoxic in murine macrophages and catechin showed moderate cytotoxicity. The trials of experimental infection showed that the crude extract of *Enterolobium ellipticum* decreased infection with intracellular parasites infection in progress, and when applied to the pre-treatment, suggesting that the extract intensifies the microbicidal mechanisms of macrophages, leading to the death of *Leishmania*. While the catechin is effective only in *dimuição* the treatment of parasite infection with already underway. The leishmanicide effect of the extract and catechin was confirmed by morphological analysis where we observed the effect on the cell membrane of the parasite and the presence of pores. These results show that the catechin is one of the active principles of *E. ellipticum* extract and that future studies are needed to assess the effects in vivo.

Keywords: *Enterolobium ellipticum*, Cerrado, *Leishmania amazonensis*, fungi, dermatophytes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida heteroxênico do protozoário.....	18
Figura 2. Estrutura química do antimoniato de meglumina.....	21
Figura 3. Estrutura química da Anfotericina B.....	22
Figura 4. Estrutura química da Miltefosina.....	23
Figura 5. Estrutura química do Fluconazol.....	25
Figura 6. Estrutura química do Itraconazol.....	25
Figura 7. Estrutura química da terbinafina.....	26
Figura 8. Estrutura química da nistatina.....	27
Figura 9. <i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.....	30
Figura 10. Esquema para obtenção do extrato bruto.....	34
Figura 11. Esquema do fracionamento químico.....	35
Figura 12. CCD dos grupos de 1 a 19.....	47
Figura 13. Fluxograma do fracionamento do extrato.....	48
Figura 14. Estrutura química de Lupenona.....	49
Figura 15. Espectro de massa do G2: Lupenona.....	50
Figura 16. Estrutura química de Taraxasterol.....	52
Figura 17. Estrutura química de 9-Hexacoseno.....	52
Figura 18. Espectro do CG e de massa de Taraxasterol+9-Hexacoseno.....	53
Figura 19. Estrutura química do Ácido betulínico.....	55
Figura 20. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Ácido betulínico.....	56
Figura 21. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ , (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Ácido betulínico.....	57
Figura 22 Espectro do HPLC do G13 com os padrões catequina e epicatequina.....	59
Figura 23 Espectro de massa da catequina.....	60
Figura 24 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) Catequina.....	61

Figura 25. Estrutura química da catequina.....	63
Figura 26. Curva de crescimento.....	67
Figura 27. Obtenção das formas amastigotas axênicas.....	68
Figura 28. Fotografias do microscópio eletrônico de varredura.....	70
Figura 29. Valores de viabilidade celular.....	71
Figura 30. Análise do efeito do extrato e da catequina em formas intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	73
Figura 31. Fotomicrografia do tratamento feito após 48 horas da infecção com <i>Leishmania GFP</i> .....	74
Figura 32. Análise do efeito do extrato e da catequina em formas intracelulares de <i>Leishmania amazonensis GFP</i> 48 horas antes da infecção.....	76
Figura 33. Fotografias de varredura- <i>Leishmania amazonensis GFP</i> na forma de amastigota foram tratadas.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Enterolobium ellipticum</i> .....	45
Tabela 2. Fracionamento do grupo 5 do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Enterolobium ellipticum</i> .....	51
Tabela 3. Fracionamento dos Subgrupos 5.7, 5.8 e 5.9 do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Enterolobium ellipticum</i> .....	54
Tabela 4. Valores de deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C ácido betulínico.....	58
Tabela 5. Valores de deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C catequina.....	62
Tabela 6. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos isolados do extrato da casca do caule de <i>Enterolobium ellipticum</i> .....	64
Tabela 7. Percentual de formas de <i>L. amazonensis</i> GFP incubadas a 34 °C em função do tempo.....	69

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ASFV – vírus febre suína africana

BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

CCD – Cromatografia em camada delgada

CD<sub>3</sub>OD – metanol deuterado

CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado

CEUA – Comitê de Ética Animal

CG – Cromatografia Gasosa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

COSY - espectroscopia de correlação (correlated spectroscopy)

d – duplete

DMSO – Dimetilsulfóxido

FM – Faculdade de Medicina

FS – Faculdade de Saúde

GFP – Green Fluorescent Protein

HMBC - heteronuclear multiple bond coherence

HPLC - High-performance liquid chromatography

HSQC - heteronuclear single-quantum coherence

HSV – vírus herpes simples

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50% do efeito leishmanicida

J – constante de acoplamento

LC - Leishmaniose Cutânea

LCDA- Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica

LCL- Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM - Leishmaniose Mucocutânea

LMGO – laboratório de micologia de Goiás

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

M - Molar

m – multiplete

m/z – relação massa/carga

MeOH - Metanol

MHz – mega-hertz

MMA – Ministérios do Meio Ambiente

mol – molaridade

EM- Espectros de massa

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO – oxido nítrico

°C - celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – solução tampão fosfato

PG – produção de prostaglandina

Ph- potencial Hidrogeniônico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN 13C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN 1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm – rotação por minuto

RPMI – PMeios Roswell Park Memorial Institute

s - singleto

SFB - soro fetal bovino inativado

t - tripleto

UV - Ultravioleta

δ – deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	Leishmaniose.....	16
1.1.1	Ciclo de vida.....	17
1.1.2	O tratamento das leishmanioses.....	19
1.1.3	Fármacos leishmanicidas e seu mecanismo de ação.....	19
1.2	Fungos dermatófitos .....	22
1.2.1	Tratamento antifúngico .....	23
1.2.2	Fármacos antifúngicos.....	26
1.3	Produtos naturais - Plantas medicinais.....	27
1.3.1	Cerrado.....	27
1.3.1.1	Família Fabaceae.....	28
1.3.1.1.1	Gênero Enterolobium.....	29
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	Coleta do material vegetal.....	33
4.2	Preparação do extrato bruto.....	33
4.3	Métodos cromatográficos.....	34
4.4	Métodos espectrométricos de análise.....	36
4.5	Atividade em <i>Leishmania amazonensis</i> .....	37
4.5.1	Cultivo dos parasitos.....	37
4.5.2	Animais.....	38
4.5.3	Ensaio in vitro com formas promastigotas.....	39

4.5.7	Ensaio in vitro com formas amastigotas.....	42
4.5.8	Análise Estatística.....	43
4.6	Atividade em fungos patogênicos humanos.....	44
4.6.1	Teste de microdiluição.....	44
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1	Fracionamento químico.....	45
5.2	Isolamento dos compostos.....	49
5.2.1	Identificação e elucidação estrutural.....	49
5.3	Atividade farmacológica.....	64
5.3.1	Análise dos ensaios in vitro com fungos dermatófitos.....	64
5.3.2	Análise dos ensaios in vitro em formas promastigotas.....	65
5.3.3	Obtenção das amastigotas axênicas.....	67
5.3.4	Avaliação da toxicidade.....	70
5.3.5.	Análise da atividade em formas amastigotas intracelular.....	72
5.3.6	Alterações morfológica em amastigotas de Leishmania.....	77
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>83</b>

# 1. Introdução

## 1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com um amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção pela doença. Aproximadamente 0.2-0.4 milhões de casos de *Leishmania* Visceral (LV) e 0.7-1.2 milhões de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorrem a cada ano. Mais de 90% dos casos de LV globais ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A leishmaniose cutânea é mais amplamente distribuído, com cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões, as Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental do Oriente Médio para a Ásia Central. (Ministério da Saúde, 2010, Alvar *et al.*, 2012). A Leishmaniose Tegumentar Americana está amplamente distribuída no Brasil. No período de 2002 a 2011, foram registrados no país 243.716 casos de LTA, com média anual de 24.372 casos novos (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014). As populações mais expostas à LTA no Distrito Federal estão concentradas em áreas rurais e de expansões urbanas, com vegetação preservada ou residual, devido a presença de hospedeiros naturais e vetores da *Leishmania*. No período de 2010 a 2012 foram registrados 186 casos de LTA, No ano de 2012 os casos autóctenes da doença na forma clínica mucosa foi de 17 casos, enquanto que na forma cutânea foram registrados 83 casos. Em 2013 não houve nenhum registro de casos na forma clínica mucosa, porém, os casos na forma cutânea foi de 100 casos. Nos primeiros seis meses de 2014 não houve nenhum caso autóctone nas formas cutânea e/ou mucosa de LTA (Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF, 2014).

O agente etiológico das leishmanioses é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. As

leishmanioses são agrupadas em duas categorias clínicas: a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea a qual pode se apresentar como Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Mucocutânea (LCM), Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica (LCDA) e Leishmaniose Cutânea Disseminada Bordeline (LCDB). As manifestações clínicas dependem da espécie do parasito causador da infecção e do estado imune do hospedeiro humano (Silveira *et al.*, 2004).

A maioria dos casos de leishmaniose cutânea no Brasil tem como agente etiológico a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A infecção por esta espécie pode se manifestar sob a forma cutânea localizada, com evolução crônica. A segunda espécie de maior prevalência entre os agentes causais de leishmaniose cutânea no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável por casos de leishmaniose cutânea e difusa. A leishmaniose difusa é de ocorrência rara (Rezende-Soares *et al.*, 2010).

#### **1.1.1 Ciclo de vida**

O gênero *Leishmania* possui ciclo biológico heteroxênico (Figura 1), cujas formas de desenvolvimento alternam-se entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, que transmitem o parasito durante o repasto sanguíneo (Sacks e Perkins, 1984). Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos obrigatórios e apresentam duas formas durante seu ciclo de vida associadas a dois tipos de hospedeiro - no invertebrado encontra-se a forma promastigota alongada e com o flagelo, e no vertebrado a forma amastigota arredondada e com flagelo interno.

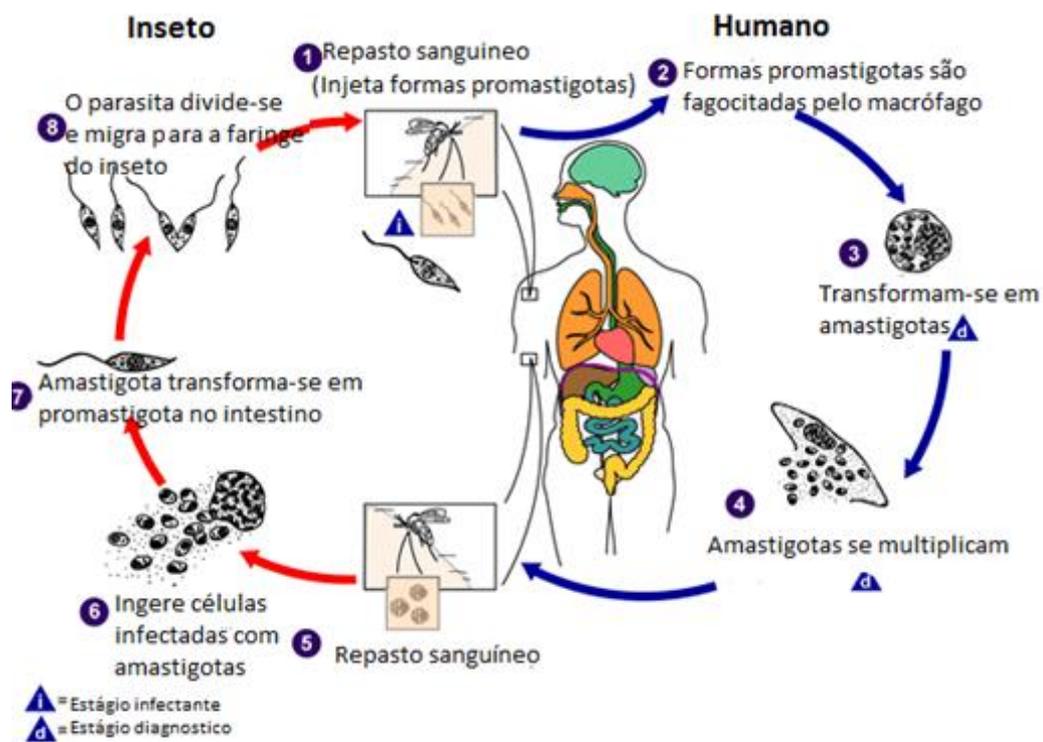


Figura 1: Ciclo de vida heteroxênico do protozoário *Leishmania* spp. Figura adaptada de: <http://www.dpd.cdc.gov/HTML/Leishmaniasis.htm>

Sua transmissão se dá através da picadura da fêmea infectada de dípteros da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecido com mosquito-palha, birigui, tatuíra, cangalha e cangalhinha (Contijo e Carvalho, 2003; Araujo *et al.*, 2014). A probabilidade de transmissão da doença depende das condições de exposição de humanos e de animais domésticos aos flebotomíneos (Guerra *et al.* 2006). O desmatamento e a urbanização são exemplos de alterações que são seguidas por mudanças principalmente, em reservatórios e na população de insetos vetores aumentando assim os casos de LTA (Reis *et al.*, 2013).

O crescimento migratório aliado ao processo histórico de organização espacial nas últimas décadas tem propiciado a proliferação de áreas de alto risco e infecção por *Leishmania* em áreas urbanas brasileiras, por consequência do desequilíbrio ecológico. Em território brasileiro a distribuição da doença ocorre

por meio de diferentes condições geográficas ou ecológicas, potencializadas pelo planejamento governamental inadequado ou ineficiente em ações que promovam a conscientização, visando o controle, prevenção ou detecção precoce da infecção em áreas de risco (Negrão e Ferreira, 2014).

#### **1.1.1.1 *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

A *leishmania (Leishmania) amazonensis* é transmitida pelo *Lutzomyia flaviscutellata*, considerada responsável pelas formas cutâneas de leishmaniose, ainda assim é capaz de causar leishmaniose visceral em alguns casos (Martinez e Persen, 2014), e é responsável pelos casos de leishmaniose cutânea difusa (LCD) que é a forma mais rara, severa e de difícil tratamento da doença (Nylén e Eidsmo, 2012). *Leishmania amazonensis* foi descrita por Lainson e Shaw (1972), as cepas foram encontradas em roedores da região amazônica. Porém o isolamento da *leishmania (L) amazonensis* foi feito por Nery-Guimarães (1951) em roedores silvestres (*Oryzomys goeldi*) e a reprodução da infecção experimentalmente em camundongos e hamsters (*Mesocricetus auratus*), que caracterizaram lesões, através de estudo histopatológico, por um infiltrado inflamatório composto principalmente por histiócitos altamente parasitados, diferentemente do padrão histopatológico apresentado por *L. (V.) braziliensis*, que tem por características uma densidade muito baixa de parasitas nas lesões ulceradas (Costa *et al.*, 2009).

#### **1.1.2 O tratamento das leishmanioses**

O tratamento das leishmanioses foi proposto em 1912 por um pesquisador brasileiro chamado Gaspar Vianna, foi ele quem descobriu a utilidade dos antimoniais no tratamento da LTA. Desde então, o tratamento continua baseado nos antimoniais pentavalentes, porém, sua alta toxicidade pode causar mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos. Posteriormente, o uso da anfotericina B e pentamidinas foi indicado para o tratamento dos pacientes, no entanto estes fármacos também são altamente tóxicos causando hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e ainda pode levar à depleção dos níveis de potássio e magnésio

no organismo (Nakamura *et al.*, 2006; Bezerra *et al.*, 2006; Ministério da Saúde, 2014). A toxicidade atrelada aos fenômenos de quimiorresistência, a administração por via parenteral e a tendência desta enfermidade à urbanização levam a necessidade da busca por moléculas, que possibilitem o desenvolvimento de novos medicamentos (Albernaz *et al.*, 2010; Croft *et al.*, 2011).

### **1.1.3 Fármacos leishmanicidas e seu mecanismo de ação**

#### **1.1.3.1 Antimoniais pentavalentes**

Os antimoniais pentavalentes (Figura 2) têm sido os fármacos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. O mecanismo de ação destes fármacos continua pouco compreendido, mas acredita-se que está ligado principalmente ao metabolismo do parasito. Particularidades químicas na composição destes fármacos podem contribuir para que ocorra o seu efeito farmacológico. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glicônico - presente no Pentostan<sup>®</sup> e no Glucantime<sup>®</sup>, são capazes de formar complexos solúveis em água com o átomo de antimônio, o que pode facilitar a distribuição dos agentes antimoniais para os macrófagos infectados (Roberts *et al.*, 1995; Sereno *et al.*, 2001).

A administração dos antimoniais pentavalentes por via parenteral (endovenosa ou intramuscular) é realizada em um esquema posológico que pode variar de 20 a 40 dias. Os efeitos colaterais incluem frequentemente arritmias e pancreatite aguda (Ferreira *et al.*, 2014).

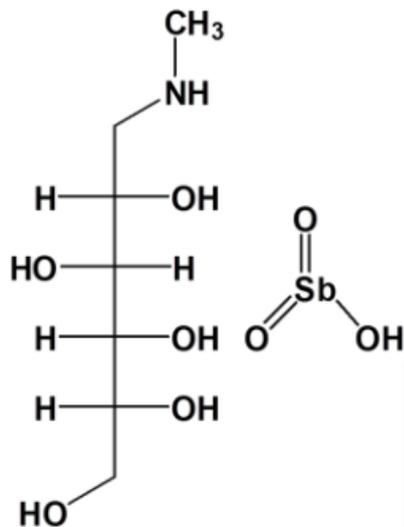


Figura 2. Estrutura química do antimoniato de meglumina

#### 1.1.1.2. Anfotericina B

A anfotericina B (Figura 3) é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. É um fármaco de segunda escolha devido aos graves efeitos adversos associados ao seu uso devendo, portanto, ser empregado apenas quando não se obtém resposta adequada ao tratamento com os antimoniais. A anfotericina B interage preferencialmente com os esteróis substituídos na posição 24 (ergosterol e episterol), comum na membrana dos parasitos; entretanto, pode ligar-se também ao colesterol presente na membrana plasmática das células do hospedeiro, causando boa parte dos efeitos tóxicos (Oliveira *et al.*, 2014)

Outra formulação mais recente é a forma lipossomal da anfotericina B, cujo uso clínico é recomendado para os casos graves de leishmanioses não responsivas ao tratamento convencional, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal (Caldas *et al.*, 2013). A forma lipossomal da anfotericina B age especificamente sobre células-alvo (macrófagos), incorporando ao meio intracelular e assim reduzindo efeitos colaterais. Seu uso é limitado pelo alto custo e pela administração endovenosa o que restringe seu uso a poucos centros

especializados e normalmente em âmbito hospitalar com acompanhamento médico e controle das reações adversas (Maciel Santos *et al.*, 2013).

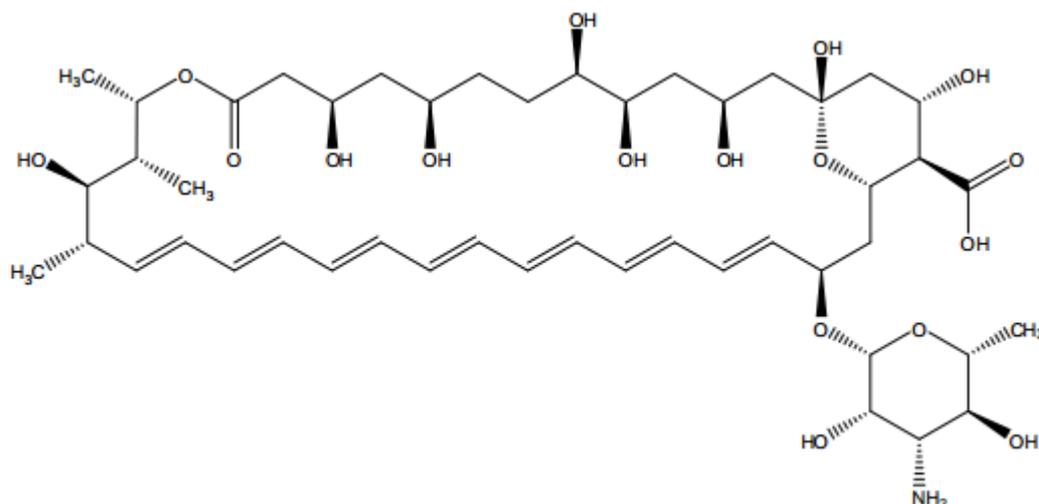


Figura 3. Estrutura química da Anfotericina B

### 1.1.3.3 Miltefosina (Hexadecilfosfocolina)

A Miltefosina (Figura 4) vem sendo utilizada na Índia, como fármaco alternativo para os pacientes que não responderam ao tratamento com os antimoniais. Em Bihar, estado ao leste da Índia, local com 90% dos casos de leishmaniose visceral do país, observou-se um aumento de mais de 50% na taxa de cura de quando era usado os antimoniais. Conseqüentemente, o uso destes não é mais recomendado no subcontinente indiano (Ferreira W. A. *et al.*, 2014).

As hipóteses de mecanismo de ação da miltefosina são reportadas em células cancerígenas e em *Leishmania*. Em células cancerígenas a atividade está associada principalmente a apoptose (morte celular programada) e à perturbação de vias de sinalização. Hipóteses recentes indicam que a miltefosina tenha mais de um local de ação (Thomas *et al.*, 2012).

Em formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, a miltefosina é capaz de induzir a apoptose celular, corroborado

pela observação, *in vitro*, de que a tolerância à morte celular programada em *Leishmania* está ligada à resistência à *multidroga* dentro do parasito (Thomas *et al.*, 2012).

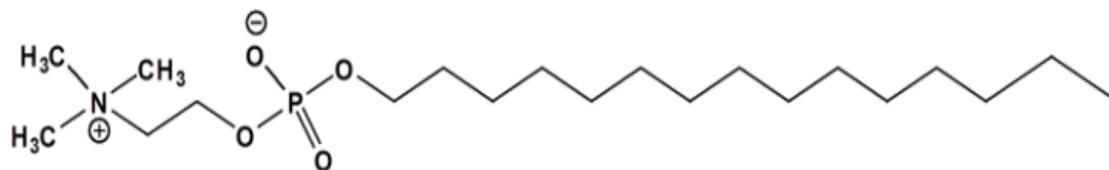


Figura 4. Estrutura química da Miltefosina

## 1.2 Fungos dermatófitos

As dermatofitoses são micoses cutâneas infecto-contagiosas, de curso crônico, causadas por um grupo de fungos denominados dermatófitos, representados pelos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* e constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica (Velez *et al.*, 2012). Baseando-se no seu habitat, os dermatófitos podem ser caracterizados em três grupos principais: os geofílicos, os zoofílicos e os antropofílicos. Os geofílicos, são os mais importantes clinicamente, estão presentes no solo decompondo vários detritos queratínicos. Os representantes principais são *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* (Seebacher *et al.*, 2008). Os zoófilos são, sobretudo parasitos de animais, mas algumas vezes são encontrados no homem, e temos como exemplos principais *M. canis* e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. Os antropófilos são tipicamente parasitos do homem. A infecção requer o contato interpessoal. Seus representantes típicos são *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* (Seebacher *et al.*, 2008).

Os dermatófitos afetam atualmente cerca de 25% da população mundial. Estima-se que 30 a 70% dos adultos sejam portadores assintomáticos. A incidência da doença tende a aumentar com a idade. A epidemiologia das dermatofitoses pode ser afetada por fatores climáticos, práticas sociais, migração de populações e características individuais (Perea *et al.*, 2010). As características patogênicas das dermatofitoses são lesões na pele, couro

cabeludo e unhas, e dependem do agente causador, do local de desenvolvimento da micose e do estado imunológico do paciente, variando assim a gravidade da infecção (Berker, 2009).

### **1.2.1 Tratamento antifúngico**

Infecções causadas por dermatófitos são, provavelmente, as doenças fúngicas cutâneas mais comuns em seres humanos e animais. Nas últimas décadas, tem aumentado o número de agentes antifúngicos utilizados na prática clínica para o tratamento das dermatofitoses. No entanto, nem todas as espécies têm o mesmo padrão de suscetibilidade e existem evidências de que os dermatófitos tenham adquirido resistência a determinados antimicóticos (Magagnin *et al.*, 2011).

### **1.2.2 Fármacos antifúngicos**

#### **1.2.2.1 Itraconazol e fluconazol**

Itraconazol e fluconazol são derivados azólicos (Figura 5 e 6) e compartilham o mesmo mecanismo de ação, são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeitos colaterais. Estes inibem a biossíntese do ergosterol, o principal esteroide presente na membrana das células fúngicas, e atuam em sistemas enzimáticos em diversos tipos celulares do homem (Bennett, 2005).

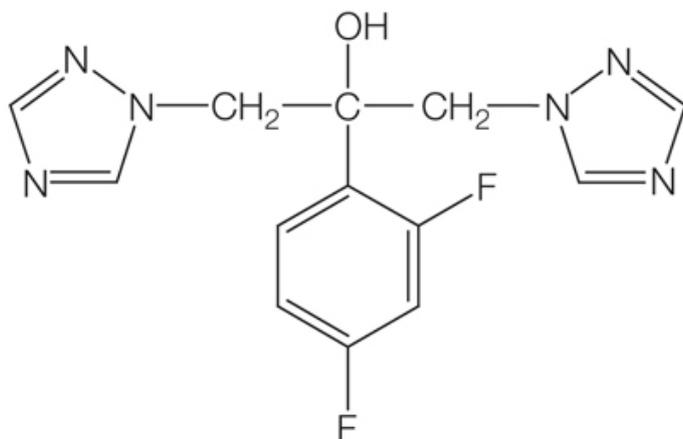


Figura 5: Estrutura química do Fluconazol

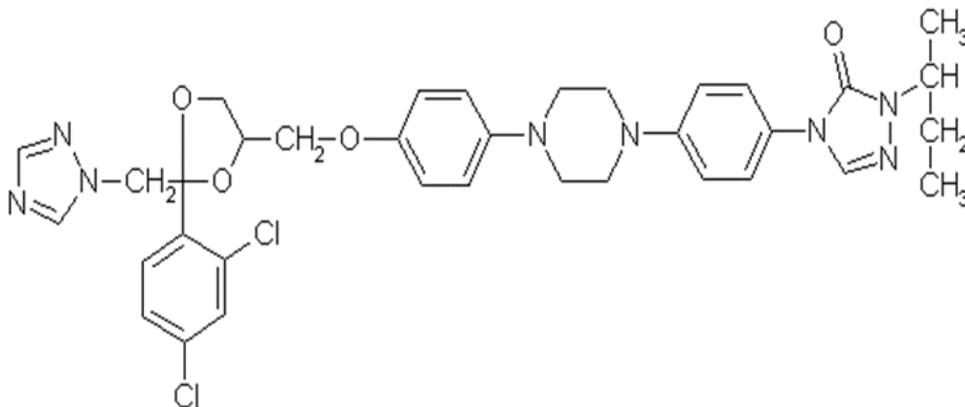


Figura 6: Estrutura química do Itraconazol

### 1.2.2.2 Terbinafina

A terbinafina (Figura 7) foi descoberta em meados de 1997, e é administrada tanto por via oral quanto por via tópica. É um inibidor reversível não competitivo da esqualenoepoxidase, uma enzima envolvida nas etapas iniciais da síntese de esteróis. Seu mecanismo de ação envolve a depleção de ergosterol e acúmulo de esqualeno, afetando a estrutura e a função da membrana, tendo portanto atividade fungicida (Odds *et al.*, 2003)

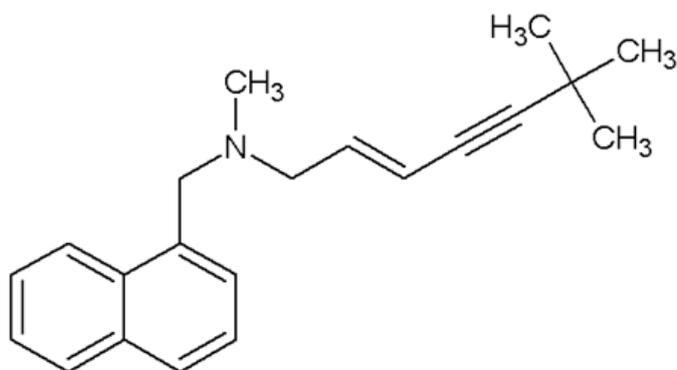


Figura 7. Estrutura química da terbinafina

### 1.2.2.3 Polienos

Pertencem a essa classe de antifúngicos a Anfotericina b, a Nistatina e a Natamicina.

A nistatina também conhecida como fungicidina, é um antibiótico macrolídeo poliênico (Figura 8). O tratamento tópico ou oral com nistatina é utilizado nos casos de susceptibilidade cutânea ou mucocutânea de infecção fúngica normalmente causadas por espécies de *Candida*, sendo o tratamento oral também utilizado nos casos de susceptibilidade de infecções na cavidade

oral (Uptodate, 2014). São amplamente utilizadas também em infecções de pele e no trato gastrointestinal (Récamier *et al.*, 2010). A nistatina possui o mesmo mecanismo de ação que a Anfotericina b que são: o aumento da permeabilidade celular, através da formação de poros ou canais ao ligar-se com o ergosterol da membrana celular fúngica, e ação oxidativa sobre as células, alterando suas funções metabólicas. Liga-se também ao colesterol das células humanas, principal razão de seus efeitos colaterais (Müller *et al.*, 2013).

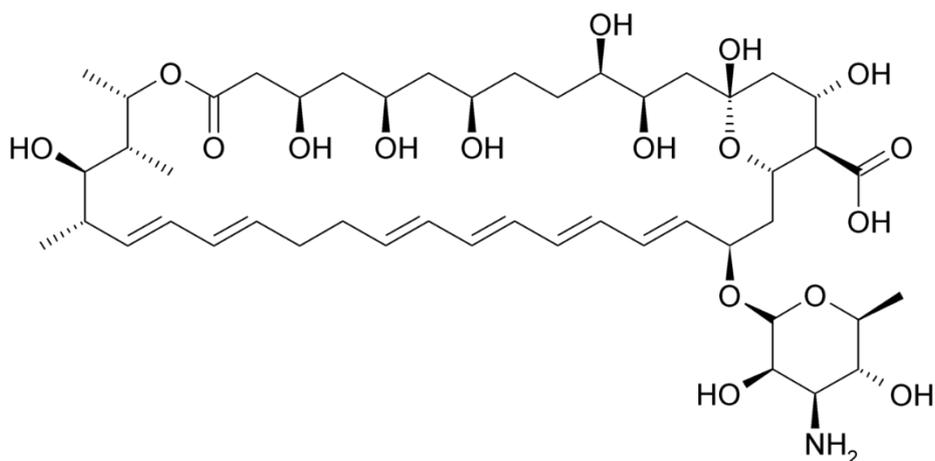


Figura 8: Estrutura química da nistatina.

### 1.3 Produtos naturais - Plantas medicinais

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à civilização humana e, ao longo do tempo, os produtos de origem mineral, animal e vegetal foram as principais fontes do arsenal terapêutico. Nos últimos anos, tem crescido o interesse nas terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas (Cragg e Newman, 2013; Lall e Kishore, 2014; Alves *et al.*, 2014).

### 1.3.1 Cerrado

O Cerrado originalmente ocupava 2.039.386 km<sup>2</sup>, cerca de um ¼ do território brasileiro. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), o Cerrado perdeu 85.074,87 km<sup>2</sup>, entre 2002 e 2008, o que representa uma taxa média de 14.179 km<sup>2</sup>/ano. Esse valor é mais que o dobro da taxa de desmatamento da Amazônia para o mesmo período. Assim sendo, o Cerrado perdeu quase 50% de sua cobertura original (Ganem, 2011). O Cerrado é considerado um dos 25 locais no planeta que apresentam alta biodiversidade, porém compõe a lista dos biomas mais ameaçados, sendo assim denominado como *hotspot* para a conservação da biodiversidade e requer bastante atenção por possuir altas taxas de endemismos e menos de 20% de sua cobertura original intacta (Silva e Santos, 2012).

O Cerrado é uma região com aproximadamente 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 endêmicas, portanto uma das mais ricas vegetações brasileiras. O clima sazonal, com invernos secos e verões chuvosos, tem influência na origem do Cerrado, pois as chuvas ao longo do tempo intemperizaram os solos deixando-os pobres em nutrientes essenciais (Silva *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2014). A degradação do Cerrado implica em perda de inúmeras espécies vegetais já identificadas ou ainda por serem catalogadas. A ocupação humana do Cerrado, substituindo a vegetação original pela agricultura, principalmente da soja, levando ao desequilíbrio nos processos químicos, físicos e biológicos do solo, provocando consequências ecológicas visíveis (Scabora *et al.*, 2010). Junto com a biodiversidade estão desaparecendo ainda as possibilidades de uso de muitos recursos, como as plantas medicinais que são abundantes no Cerrado, impossibilitando assim a continuação da utilização das plantas medicinais da forma tradicional e dos estudos científicos realizados com as mesmas.

### **1.3.1.1 Família Fabaceae**

A família Fabaceae constitui uma das maiores do filo das Angiospermas, com 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies. Apresenta ampla distribuição, estando presente tanto em florestas tropicais quanto em desertos, planícies e regiões alpinas (Doyle *et al.*, 2003). Seus representantes correspondem à diferentes tipos de hábito: árvores como o pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e o jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell) Allemão ex Benth.), arbustos como topete-de-cardeal (*Calliandra tweediei* Benth) e plantas aquáticas como *Neptunia pubescens* Benth. Segundo Mendonça e colaboradores. (1998), esta é uma das famílias mais representativas do bioma Cerrado, em número de espécies, sendo muitas utilizadas na medicina tradicional.

#### **1.3.1.1.1 Gênero *Enterolobium***

O gênero *Enterolobium* é facilmente reconhecido pelo fruto legume bacóide ou nocóide, com os formatos auriculiformes, circulares, contorcidos, circinados ou recurvados (Mesquita, 1990). Suas folhas, goma e seiva são utilizadas na medicina popular para tratar infecções pulmonares e dermatites. E sua casca produz um poderoso vermífugo (Silva Junior, 2005).

A espécie *Enterolobium ellipticum* Benth (Figura 9) pertencente à família Fabaceae e é conhecida como “favela branca”, é uma árvore pequena de até 5 metros, com folhas compostas, folíolos verde-escuros na parte superior e verde-claros na parte inferior, flores branco-amareladas e frutos vagem coriácea. A madeira é utilizada na construção civil (Correa, 1926-1978).



Figura 9. *Enterolobium ellipticum* Benth. – Fabaceae: A= árvore, B= botão floral  
C= frutos (Arquivo de laboratório de farmacognosia/UnB).

## 2. Justificativa

As leishmanioses fazem parte de um grupo de doenças classificadas como negligenciadas e as dermatofitoses são doenças infecto-contagiosas. As alternativas terapêuticas para os tratamentos tanto para leishmaniose quanto as dermatofitoses são caracterizadas por tratamentos com alguns inconvenientes, como efeitos adversos, toxicidade, resistência crescente aos medicamentos disponíveis e manejo clínico com fármacos similares, como a anfotericina B. (Chakravarty e Sundar, 2010; Tiuman *et al.*, 2011; Santana, 2013). Diante dessas dificuldades, existe a necessidade de desenvolver novas tecnologias de controle e tratamento na busca por qualidade de vida e controle de doenças de importância em saúde pública. Assim, a descoberta de compostos naturais com atividade leishmanicida e fungicida, vêm surgindo como uma alternativa para o tratamento estimulando a pesquisa com o uso de substâncias provenientes de planta (Oliveira *et al.*, 2013).

O objeto de estudo do presente trabalho foi a biodiversidade encontrada no bioma Cerrado, segundo maior bioma do Brasil e biologicamente a região de savana mais rica do planeta (WWF Brasil, 2014). Buscou-se identificar a atividade farmacológica do extrato bruto da casca do caule de acetato de etila do *Enterolobium. ellipticum* e de seus compostos isolados e identificados. Sendo esta espécie selecionada para o fracionamento devido a resultados prévios do grupo de pesquisa (Santana, 2013). Apresentando atividade tanto em formas promastigostas *Leishmania (L.) amazonensis*, responsável pela forma cutânea da leishmaniose, quanto em *Trichophyton*, causador da dermatofitose.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum* Benth (Fabaceae) e das substâncias isoladas em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em fungos dermatófitos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* em *L. (L.) amazonensis*
- Realizar o fracionamento químico do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*
- Elucidar as estruturas dos compostos isolados
- Definir a atividade dos compostos isolados em *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton tonsurans*
- Avaliar a atividade dos compostos isolados em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*
- Determinar a citotoxicidade dos compostos isolados em macrófagos murinos
- Avaliar a morfologia do parasito *Leishmania amazonensis* após ação do extrato e dos compostos isolados

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1 Coleta da espécie *Enterolobium ellipticum* Benth (Fabaceae)**

A casca do caule de *Enterolobium ellipticum* Benth foi coletada em 2013, na área da Lagoa Formosa/Planaltina - DF, Latitude sul 15° 27' 34,2"; Longitude oeste 47° 92' 3,3"; Altitude 1.071 metros, em parceria com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB.

### **4.2 Preparação do extratos bruto**

A casca do caule foi dessecada, estabilizada e pulverizada utilizando um moinho de facas. Uma parte (1000 g) foi submetida ao processo de extração por maceração utilizando como líquido extrator o solvente acetato de etila. A solução extrativa foi recuperada por filtração e concentrada a pressão reduzida em rotaevaporador a 40 °C. Foi obtido 38 g de extrato bruto (Figura 10).

O extrato vegetal bruto obtido foi depositado no Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB, a -20 °C. O acesso ao patrimônio genético é autorizado sob o número 06/2012 de acordo com a Resolução CGEN n. 35, após análise vinculada as informações e termos do processo 02000.002272/2006-73.

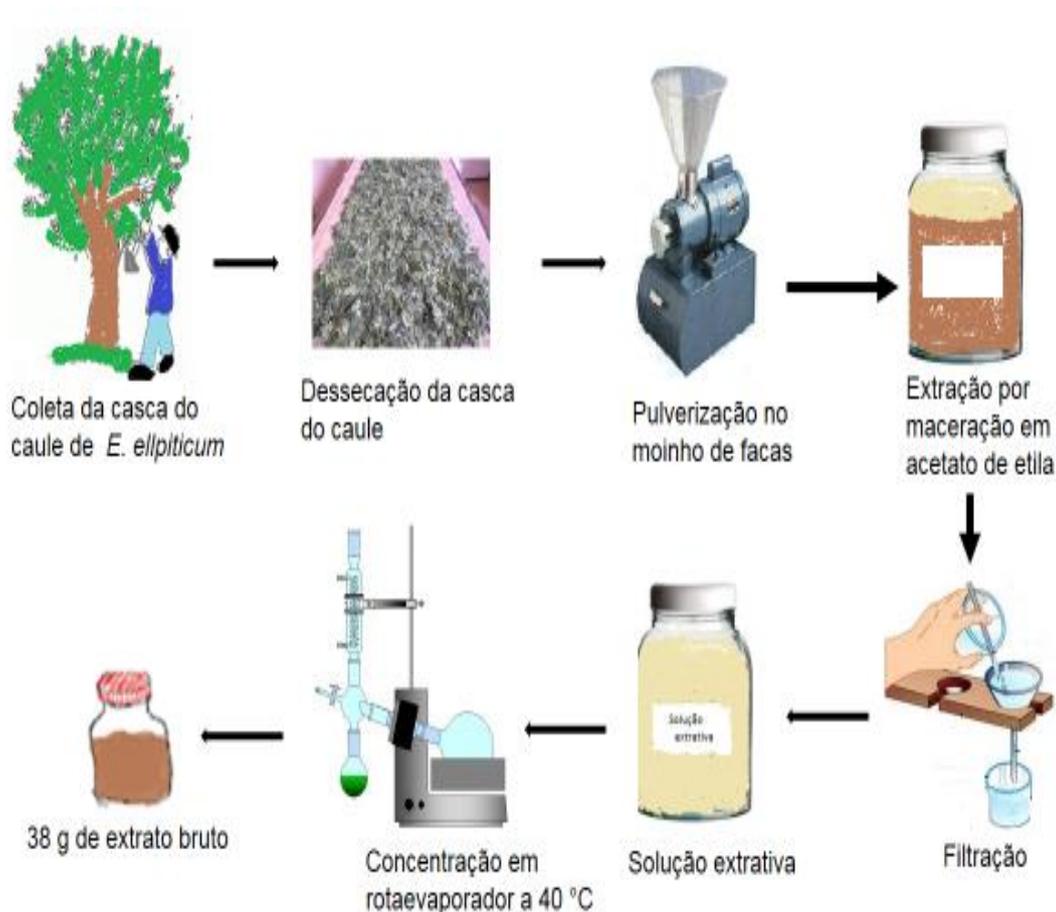


Figura 10. Esquema para obtenção do extrato bruto da casca do caule de *Enterolobium ellipticum* Benth. (Fabaceae)

### 4.3 Métodos Cromatográficos

#### 4.3.1 Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum*

O extrato bruto (30 g) foi fracionado por cromatografia em coluna aberta de sílica gel (245 g, sílica gel 60 230-400 mesh) em coluna de vidro. Os solventes utilizados foram o ciclohexano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em gradientes crescentes de polaridade (Figura 11). O fracionamento do extrato foi realizado no laboratório de farmacognosia/UnB.

O monitoramento do processo de separação foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel sobre alumínio (Sigma®), e como eluente os solventes ciclohexano, acetato de etila, metanol e ácido

fórmico, sozinhos ou em um gradiente de polaridade crescente. As placas foram observadas em luz ultravioleta 254 e 366 nm e reveladas com solução de vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento a 100 °C por aproximadamente 3 minutos.

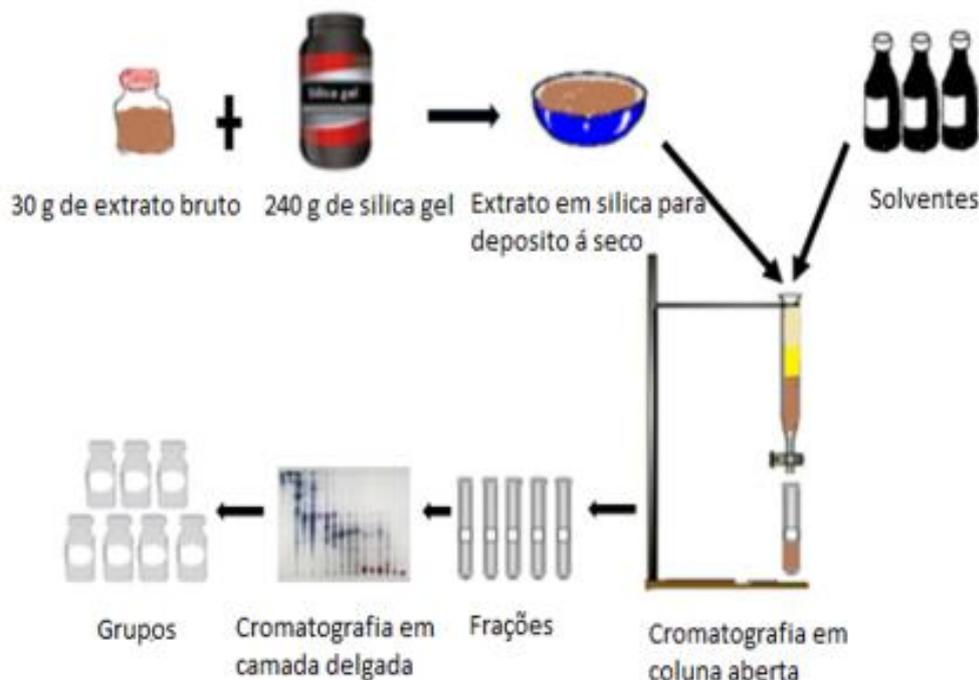


Figura 11. Esquema do fracionamento químico do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum*

#### 4.3.2 Cromatografia gasosa (CG)

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Para a identificação de algumas das substâncias foi realizada cromatografia gasosa. A identificação foi baseada na comparação dos seus espectros de massa com a biblioteca Wiley 275. O aparelho empregado para a análise foi um CG-EM HP 6890 series, coluna HP 19091S-433 325 C Max 5% fenil metil sitoxano. O detector seletivo de massa utilizado foi um Hewlett-Packard (HP) 5973 no modo de ionização EI (70 eV),

interface com uma HP 6890. O cromatógrafo a gás possuía uma coluna capilar HP-5 MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm). O programa de temperatura utilizada foi de 60 °C (5 min) a 280 °C a uma taxa de 3 °C / min, seguido por um tempo estático de 15 min a 280 °C. A temperatura de injeção foi de 200 °C; a taxa de fluxo do gás portador (hélio) foi de 0,8 mL / min. Os índices de retenção (IR) para todos os compostos foram determinados de acordo com Van den e Kratz (1963).

### **4.3.3 Análise HPLC**

HPLC significa Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês, HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Se distingue por usar a fase móvel à alta pressão (daí o "pressure" da sigla em inglês). O uso de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica. O uso de partículas menores (na ordem de 5,0 µm) no recheio da coluna resulta em uma área superficial, o sítio de adsorção, maior (geralmente da ordem de centenas de metros quadrados por grama de fase estacionária), o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra.

O sistema usado para análises de HPLC foi o Thermo Finnigan equipado com uma bomba P4000, um amostrador automático AS3000, um degaseificador 1000 e um detector (PDA) UV6000LP. As amostras foram separadas em uma coluna RP-18 (250 x 4,6 mm x 5,0 µm). A injeção foi realizada por uma válvula Rheodyne (Modelo 77251) com 20 mL de ciclo fixo. Dados cromatográficos foram adquiridos usando versão ChromQuest software 4.1.

## **4.4 Métodos Espectrométricos de Análise**

Todos os métodos espectrométricos de análise foram realizados no laboratório de farmacognosia da Universidade Nacional e Karpodistrian de Atenas, Grécia.

#### **4.4.1 Ressonância magnética nuclear**

A ressonância magnética nuclear (RMN) é sem dúvida uma das mais poderosas técnicas de espectros para estudo das estruturas de moléculas orgânicas. Na técnica de 1D podemos obter espectro de uma dimensão e na 2D podemos obter espectro em duas dimensões, sendo que essa técnica permite correlacionar hidrogênios e carbonos que possuem relação escalar. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos através do aparelho Bruker DRX- 400 e 600 Hz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio ou metanol deuterados (98 – 99,9%).

#### **4.4.2 Espectroscopia de massa**

Dentre as várias opções existentes no momento, a espectrometria de massas (EM) é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias. Os valores das massas moleculares das substâncias isoladas foram obtidos através do aparelho LTQ – ORBITRAP Espectroscopia de massa. As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 1 mg/mL. A interpretação dos espectros de massa permitiu calcular a massa do composto, e associada à interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu deduzir sua fórmula bruta.

#### **4.5 Atividade em *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

As análises da atividade em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram realizadas Laboratório de Microscopia Eletrônica/UnB.

##### **4.5.1 Cultivo dos parasitos**

Os parasitos utilizados nesse estudo foram da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* - cepa MHOM/BR/PH8 e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* transfectadas com GFP (Green Fluorescent Protein). O gene GFP foi isolado do cnidário *Aequorea victoria*, pelos pesquisadores Shimomura e Johnson em 1961. Em 1979, foi descrita a estrutura química do cromóforo GFP. Entretanto, apenas em 1994 a GFP foi clonada e expressa em organismos

procarióticos e eucarióticos por Chalfie *et al* (1994). As formas promastigotas das leishmanias foram mantidas sob criopreservação no Laboratório de Microscopia Eletrônica/UnB. Para serem descriopreservadas, as formas promastigotas foram transferidas para o meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), e mantidas por três dias, em seguida, transferidas para o meio de cultura de acordo com a cultura.

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider, pH 7,4, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma®), e 0,2% de sulfato de gentamicina (Schering-Plough). Os parasitos foram cultivados a 26 °C, até que os mesmos atingissem a fase log de crescimento. Para a manutenção foram realizados repiques a cada 3 dias.

A cultura de *Leishmania (L.) amazonensis* transfectadas com GFP foi mantida em meio M199 (Sigma®), acrescido de 10% de SFB, e 1 mg/mL do antibiótico Geneticin®. A cultura dos parasitos foi mantida da mesma forma que descrita no parágrafo acima.

As formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider, pH 5,5, suplementado com 5% SFB, 0,2% de sulfato de gentamicina e mantidas a 32 °C. Os parasitos foram utilizados para o experimento no 5º dia de cultivo. Este período corresponde a uma cultura rica em formas promastigotas metacíclicas - determinado através de curva de crescimento celular realizado no início da manutenção dos parasitos.

#### **4.5.2 Animais**

Nos testes *in vitro* com macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos Balb/C. Os animais foram mantidos no alojamento de animais FS/FM em gaiolas de polipropileno com água e ração Purina® (Labina) *ad libitum*, temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), umidade de 40-50%, e ciclo de claro/escuro de 12 h. O local teve o mínimo de ruídos. Os animais apresentaram entre 25 e 30 g e tempo de vida de dois meses.

O número de animais utilizados foi o menor possível, resguardada a quantidade necessária para garantir redução de erros experimentais. Todos os experimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal da Resolução n. 592/92. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Brasília, CEUA/UnB IB 137959/2013.

#### **4.5.3 Ensaios *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* transfectadas com GFP**

##### **4.5.3.1 Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* transfectadas com GFP tratadas.**

Para a observação do perfil de crescimento da *L. (L.) amazonensis* transfectadas com GFP, os parasitos, a partir de uma cultura em fase estacionária, foram semeados em garrafas de cultivo de células, em duplicata, na concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL. Em seguida, foram adicionadas as amostras (tratamento) na concentração inibitória de 50% dos parasitos. Como controle, foi utilizado o DMSO a 1% e o meio de cultura. Esse foi considerado o primeiro dia da cultura, e a partir desta data foi realizada contagens diárias, em triplicata, dos parasitos, com auxílio da câmara de Neubauer. O azul de tripano (corante) 0,4% foi utilizado como marcador de viabilidade celular.

##### **4.5.3.2 Atividade anti-*Leishmania (L.) amazonensis* GFP**

Em uma placa de cultura celular de 96 poços foram colocados 100  $\mu$ L de meio de cultura Schneider. As amostras foram colocadas nos primeiros poços, e então foi feita a diluição seriada. Em seguida, uma suspensão de  $10^5$  formas promastigotas foi acrescentada, e o volume final do poço completado para 200  $\mu$ L. A concentração final das amostras na primeira diluição foi de 100  $\mu$ g/mL e na última de 1,5625  $\mu$ g/mL. A placa foi incubada por 48 h a 22-26 °C. Após este período foi adicionado 100  $\mu$ g/poço de uma solução de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) em PBS a 5 mg/mL (Sigma<sup>®</sup>), por 4

h à 37 °C, protegida da luz. Em seguida, foram adicionados 100 µL de DMSO para a liberação dos cristais de formazan. A leitura foi feita por absorvância medida em espectrofotômetro a 570 nm. Esses experimentos foram realizados em triplicata, permitindo a determinação do valor de 50% da inibição do crescimento (IC<sub>50</sub>) por regressão linear no programa Microsoft Excel®. O controle positivo utilizado foi a anfotericina B (Ambisome®), e o controle negativo apenas meio de cultura e parasito.

#### **4.5.4 Padronização da infecção de macrófagos por promastigotas *Leishmania (L.) amazonensis* GFP**

##### **4.5.4.1 Obtenção de macrófagos peritoneais**

As células peritoneais de camundongos Balb/C, submetidos à eutanásia em câmara contendo CO<sub>2</sub>, foram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de PBS, a 4 °C. Em seguida, as células peritoneais foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min, e ressuspendidas com 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e 25 µg/mL de gentamicina. As células foram quantificadas em hematocitômetro.

##### **4.5.4.2 Ensaio de pré-tratamento dos macrófagos peritoneais**

Foram semeadas 1 x 10<sup>6</sup> macrófagos em cada poço de uma placa de 6 poços. A placa foi mantida a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para a adesão das células. O meio de cultura foi aspirado e as células foram pré-tratadas, por um período de 24 h, com o extrato bruto ou compostos isolados. O controle negativo foi feito com RPMI com 1% DMSO. Após este período, o meio foi retirado e os poços foram lavados 2 vezes com PBS a 37 °C para remover a maior quantidade possível das amostras testadas. Em seguida, os parasitos foram adicionados aos poços na proporção de 10:1 (parasito:macrófago), e a placa foi incubada por 3 h na estufa de cultivo celular. Após este período, os poços foram lavados por 2 vezes com PBS, e novamente adicionado meio de cultura RPMI, e as placas incubadas na estufa de cultivo celular por mais 72 h. No final, os poços foram lavados 3 vezes com PBS. O controle negativo foi o meio de cultura com DMSO

e o controle positivo utilizado foi a anfotericina B. A leitura –foi realizada em citômetro fluxo.

#### **4.5.4.3 Ensaio de tratamento pós-infecção dos macrófagos peritoniais**

Foram transferidos  $1 \times 10^6$  macrófagos para cada poço de uma placa de 6 poços. As placas foram mantidas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após esse tempo, os parasitos foram adicionados aos poços na proporção de 10:1 e as placas foram incubadas por 3 h em estufa de cultivo celular. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e substituído por um novo. Após 48 h de ocorrência a infecção, as células foram tratadas com as amostras por 24 h. A cada 24 h o meio com o tratamento era trocado, até completar 72 h de incubação em estufa de cultivo celular. No final, os poços foram lavados 3 vezes com PBS. A leitura –foi realizada em citômetro fluxo. O controle negativo foi o meio de cultura com DMSO e o controle positivo utilizado foi a anfotericina B.

#### **4.5.5 Análise quantitativa por citometria de fluxo**

Para a contagem dos parasitos por citometria de fluxo, os macrófagos foram removidos da placa, e centrifugados a 300 rpm por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 300 µL de PBS. Foram adquiridos 10.000 eventos e analisados pelas fluorescências nos canais de aquisição FL1H em escalas logarítmicas.

#### **4.5.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos**

Foram adicionados  $10^6$  macrófagos por poço em placa de 96 poços. E em seguida, a placa foi incubada a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 12 h. O meio de cultura foi então removido e adicionada as amostras teste, previamente diluídas em meio de cultura, e a placa recolocada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. A viabilidade celular foi verificada por adição de 100 µg/poço de MTT diluído

em PBS (mg/mL) e deixado por 4 h. E seguido da remoção do meio de cultura e adição de 100 µL de DMSO - adicionado para rompimento da membrana celular e liberação dos cristais de formazan. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. O IC<sub>50</sub> foi calculado por regressão linear em Excel®.

#### **4.5.7 Ensaios *in vitro* com formas amastigotas**

##### **4.5.7.1 Ensaios com formas amastigotas axênicas**

A cultura de amastigotas axênicas foi realizada a partir de uma cultura em fase estacionária de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP. A concentração final prevista para a cultura foi de 5x10<sup>6</sup> parasitos/mL. O cultivo foi feito em meio Schneider suplementado com 5% SFB, em pH 5,5 e mantidas a 32 °C em estufa incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2002).

A cinética de transformação das formas promastigotas em amastigotas axênicas foi acompanhada em uma curva de crescimento. A transformação *in vitro* foi realizada, em duplicata, em garrafas para cultivo de células. As diferentes formas do parasito: promastigota flagelada, alongada sem flagelo, oval sem flagelo e amastigota esférica foram quantificadas em 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, a fim de determinar o tempo necessário para a aquisição de 100% das formas amastigotas axênicas. Após a padronização do cultivo (somente formas amastigotas) foram iniciados os ensaios utilizando as amostras escolhidas.

##### **4.5.7.2 Transformação cíclica das amastigotas axênicas em promastigotas**

Foi realizado um ensaio para investigar a capacidade das formas axênicas em se diferenciarem em formas promastigotas. Uma cultura contendo as formas amastigotas axênicas foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min, e colocadas em meio Schneider suplementado com 5% SFB, pH 7,4 e mantidas a 26 °C por

96 h. A viabilidade celular foi observada a cada 24 h, por meio da observação em microscópio de uma alíquota da cultura corada com azul de tripano. O controle foi feito por comparação, utilizado foi uma cultura de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP.

#### **4.5.7.3 Alterações morfológicas em formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP**

As formas amastigotas axênicas foram cultivadas em placa de 6 poços e mantidas a 32 °C em BOD. No terceiro dia de cultivo foram adicionadas as amostras, na concentração determinada em ensaio prévio para o IC<sub>50</sub>. O DMSO foi utilizado como controle negativo e a anfotericina B como controle positivo. Os parasitos de cada poço foram coletados em 24, 48 e 72 h, para em seguida serem processados para posterior análise em microscopia de varredura.

Para microscopia eletrônica de varredura, as amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e em seguida o *pellet* foi lavado 2 vezes com PBS. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 a 4 °C por 24 h. Em seguida, o material foi centrifugado e lavado novamente com o tampão e montado em lamínulas de vidro previamente recobertas com poli-L-lisina para adesão dos parasitos. A pós-fixação foi realizada com solução contendo 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio por 30 min à temperatura ambiente, protegido da luz. Posteriormente, foi realizada desidratação em série, com acetona, 2 vezes por 5 minutos, em concentrações crescentes - 50, 70, 90 e 100%. As lamínulas foram secas com CO<sub>2</sub> em seu ponto crítico e montadas em *stubs*, metalizadas com platina e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 7001F.

#### **4.5.8 Análise Estatística**

Os cálculos de porcentagens e gráficos dos tratamentos em macrófagos murinos foram feitos no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). A viabilidade celular e os valores de IC50 foram analisadas pelo programa SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, LLC, EUA) e pelo programa Excel® (Microsoft). A análise dos resultados da citometria de fluxo foi realizada no programa FlowJo v.5.2.7 (Tree Star, Inc). As médias foram analisadas e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados indicativos de significância.

#### **4.6 Teste de microdiluição para avaliação de atividade antifúngica**

O inóculo foi preparado a partir de cultura de 5 dias para as espécies do gênero *Trichophyton*. No dia do teste verteu-se a solução salina estéril 0,85% no tubo de ensaio que continha o fungo e utilizando-se uma alça de platina foi realizada uma raspagem na superfície do fungo até que a solução salina adquirisse a turbidez e a densidade celular ajustada para a escala padrão 0,5 de McFarland. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão contendo  $1 \times 10^6$  células/mL. Em seguida foi feita uma diluição em meio RPMI na proporção de 1:50 (suspensão salina: meio RPMI). A concentração final do inóculo utilizado foi de  $2-4 \times 10^4$  células/mL..

O teste de microdiluição foi realizado em placa estéril de 96 poços de fundo redondo. Inicialmente, foram colocados 100  $\mu$ L meio RPMI em todos os poços da placa. Em seguida, nos poços da primeira coluna, foram adicionadas as soluções contendo as amostras, os controles positivos anfotericina B e itraconazol a 16  $\mu$ g/mL e fluconazol a 64  $\mu$ g/mL. A penúltima fileira da placa corresponde ao controle de crescimento, e contém apenas meio RPMI e fungo. Já a última fileira da placa corresponde ao controle de esterilidade e contém apenas o meio RPMI.

Foram realizadas diluições seriadas e as concentrações variaram entre 1000 a 1,95  $\mu$ g/mL. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L do inóculo. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 5 dias.

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita visualmente da direita para a esquerda observando o crescimento no fundo do poço. O primeiro

poço onde não foi observado crescimento fúngico, foi considerado o valor de CIM (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Fracionamento químico

O fracionamento cromatográfico de 30 g extrato resultou em 480 frações, que foram reunidas em 19 grupos (Tabela 1; Figura 12 e 13) após a análise do perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD).

Tabela 1. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum*

Grupo	Fração	Eluente	Massa (gramas)/Rendimento (%)
1	1-11	Ciclohexano: 100	0,0672/ 0,224
2	12-20	Ciclohexano:90 Acetato:10	1,4217/ 4,739
3	21- 26	Ciclohexano:80 Acetato:20	0,8166/2,722
4	27-31	Ciclohexano:80 Acetato:20	0,6824/2,274
5	32-36	Ciclohexano:70 Acetato:30	1,0328/3,442
6	37-40	Ciclohexano:70 Acetato:30	0,8334/2,778
7	41-60	Ciclohexano:60 Acetato:40	--
8	61-70	Ciclohexano:50 Acetato:50	0,2209/0,7363
9	71-85	Ciclohexano:50 Acetato:50	0,3809/1,2696

10	86-114	Ciclohexano:50 Acetato:50	0,3197/1,0656
11	115-119	Acetato:60 Ciclohexano:40	0,1645/0,5483
12	120-129	Acetato:60 Ciclohexano:40	0,2237/0,7456
13	130-134	Acetato:70 Ciclohexano:30	0,2554/0,851
14	135-140	Acetato:70 Ciclohexano:30	0,1409/0,4696
15	141-149	Acetato:80 Ciclohexano:20	0,2012/0,6706
16	150-207	Acetato:90 Ciclohexano:10	1,4434/4,8113
17	208-214	Acetato: 100	1,0434/3,4780
18	215-249	Acetato: 99,5 Metanol:5	1,6927/5,6423
19	250-480	Acetato: 98 Metanol:2	7,9/26,333

---

-: não determinado

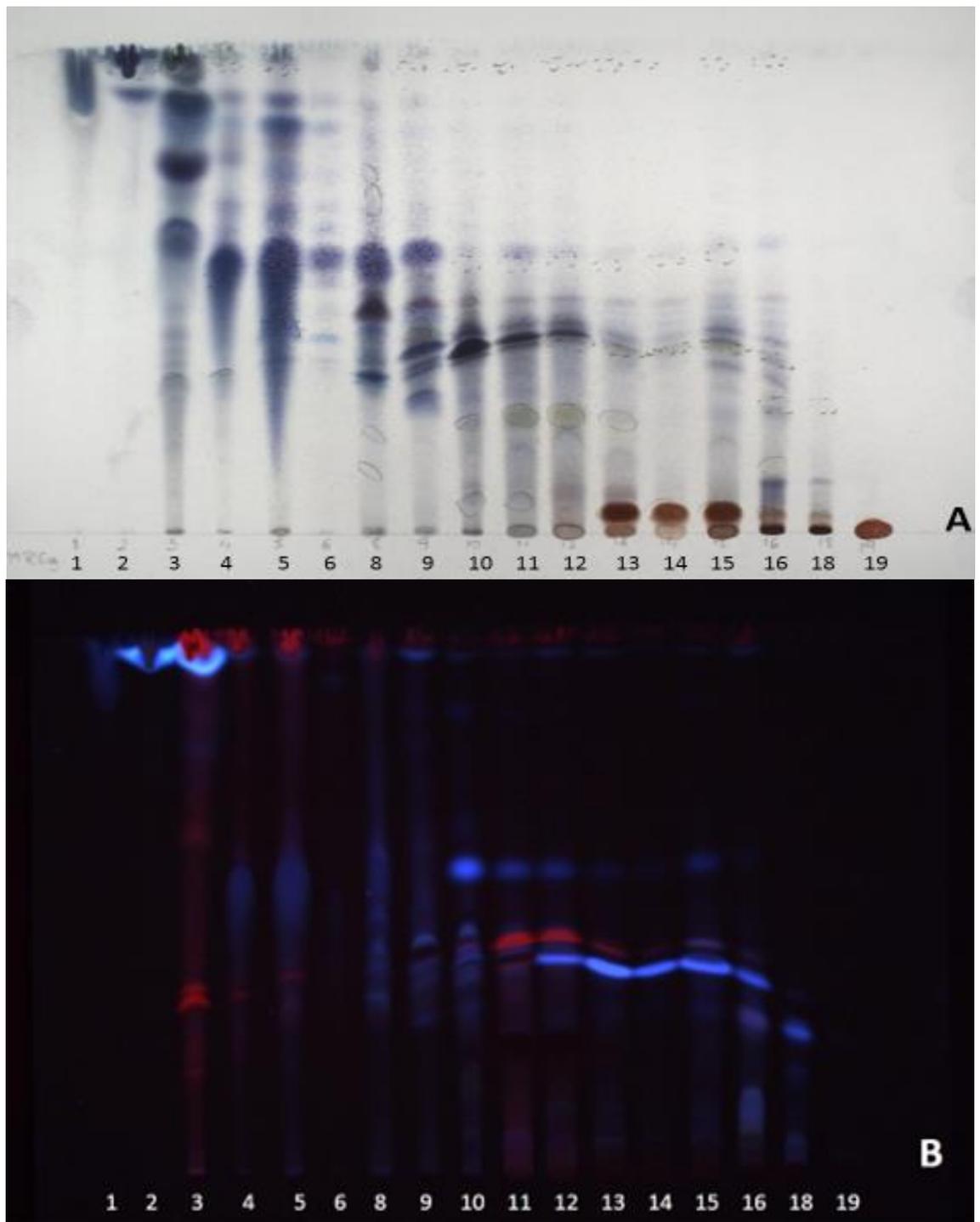


Figura 12. A. CCD dos grupos de 1 a 19 revelados com vanilina sulfúrica. B. CCD dos grupos 1 a 19 visualizadas em câmara de UV 366 n

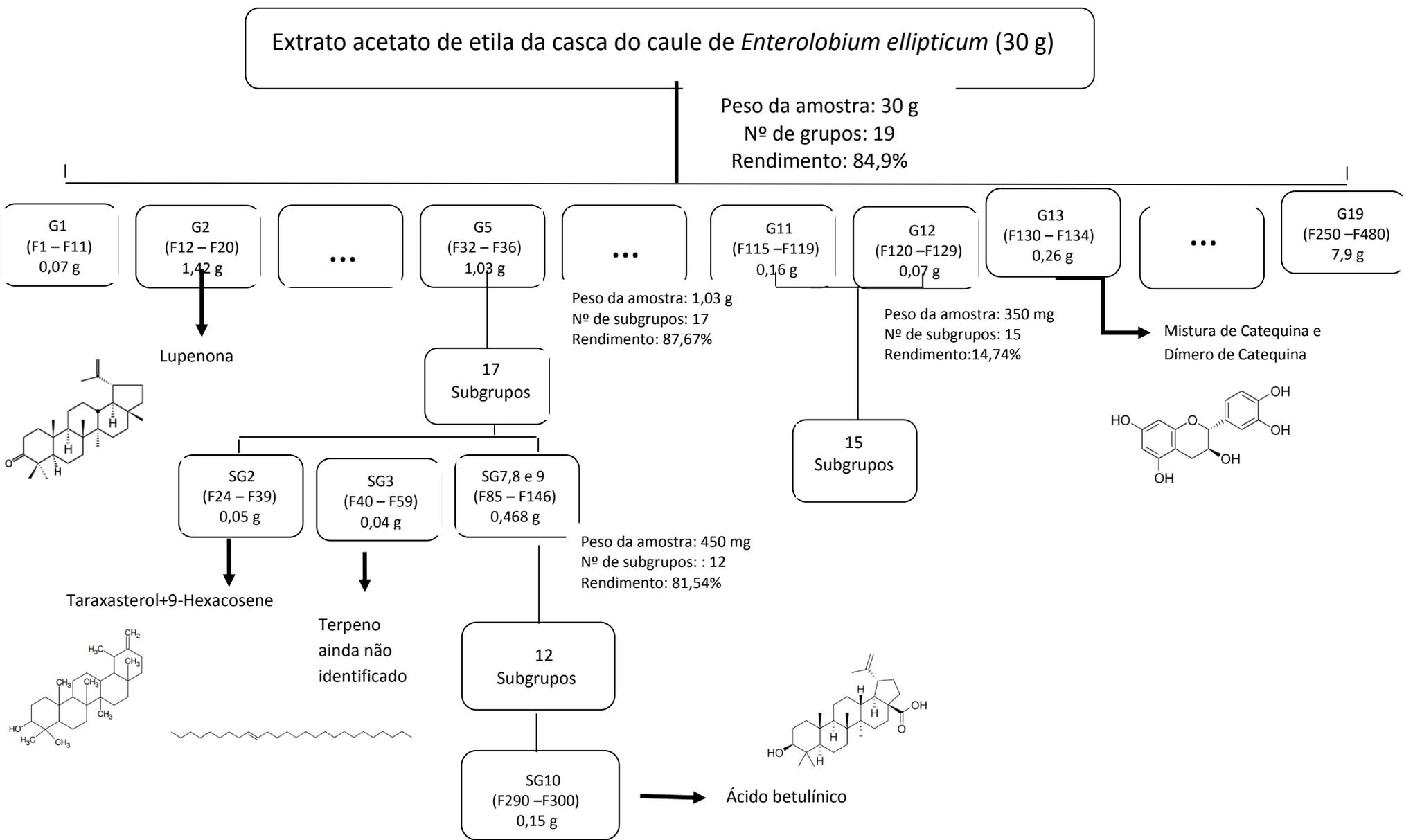


Figura 13. Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium*

## 5.2 Isolamento das substâncias de *Enterolobium ellipticum*

### 5.2.1 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados

O grupo G2 (F12-F20) foi analisado em CG-EM e permitiu a identificação de um triterpeno denominado lupenona (Figura 14). A determinação foi realizada pela comparação do tempo de retenção, obtido com o cromatograma (Figura 15) e pelo espectro de massa com os dados da plataforma Wiley 275.

A fórmula molecular da lupenona (G2) é  $C_{30}H_{48}O$ , de nomenclatura sistemática 3-Lupenona e massa molecular ( $m/z$ ) de 424 g/mol.

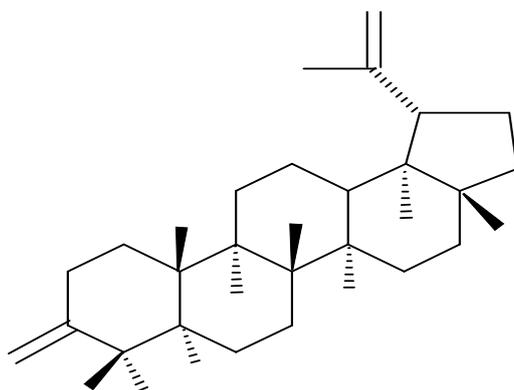


Figura 14. Estrutura química de Lupenona

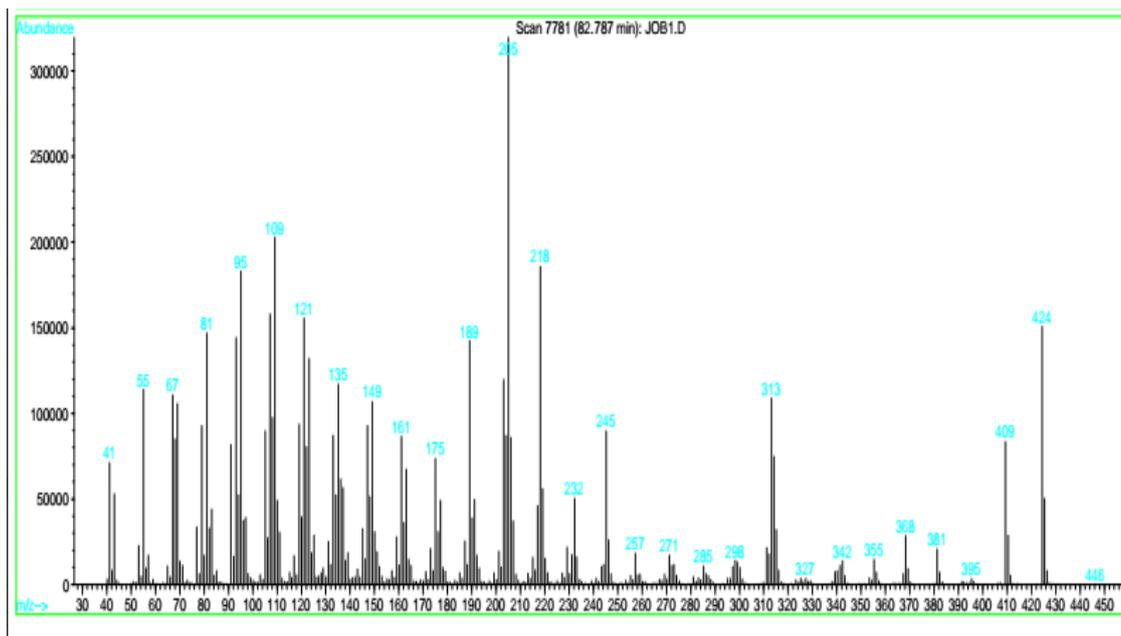


Figura 15. Espectro de massa do grupo G2 (F12-F20): lupenona. Eixo x se refere a razão massa/carga e o eixo y a abundância.

A lupenona é um triterpeno pentacíclico presente em várias espécies de plantas, e descrito na literatura com diferentes atividades biológicas. Possui atividade inibitória em vírus herpes simplex HSV-1 e HSV-2, e em vírus da febre suína africana (ASFV) (Madureira *et al.*, 2003, Cavaleiro *et al.*, 2011), foi ativo em fungos do tipo *Saccharomyces cerevisiae* e *Microsporum gypseum*, e bactericida em espécies de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Estudos ainda relatam sua atividade antioxidante (inibição da peroxidação lipídica) (Kim *et al.*, 2001) e atividade hipoglicemiante *in vivo* (Feng *et al.*, 2014).

**O grupo G5 (F32-F36)** (1,03 g) foi submetido à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (60 g) utilizando como fase móvel um gradiente de ciclohexano:acetato de etila, variando entre 95:5 a 80:20. As 389 frações obtidas foram reunidas em 17 sub-grupos (SG5.1 a SG5.17), de acordo com o perfil em CCD (Tabela 2).

Tabela 2. Fracionamento do grupo G5 do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum*

Subgrupos	Subfração	Eluente	Massa (gramas)
5.1	1-23	Ciclohexano:95 Acetato:5	0,0467
5.2	24-39	Ciclohexano:97 Acetato:3	0,0478
5.3	40-55	Ciclohexano:97 Acetato:3	0,0429
5.4	56-59	Ciclohexano:97 Acetato:3	0,0307
5.5	60-68	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,0353
5.6	69-84	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,0423
5.7	85-97	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,1037
5.8	98-122	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,2109
5.9	123-146	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,1534
5.10	147-170	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,0351
5.11	171-212	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,1924
5.12	213-248	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,0795
5.13	249-252	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,0029
5.14	253-277	Ciclohexano:90 Acetato:10	0,0884
5.15	278-298	Ciclohexano:80 Acetato:20	0,0136
5.16	299-328	Ciclohexano:80 Acetato:20	0,067
5.17	329-389	Ciclohexano:80 Acetato:20	0,0364

Os subgrupos **SG5.2** e **SG5.3** foram submetidos a CCD preparativa com o sistema eluente ciclohexano:acetato de etila 80:20. As bandas presentes foram marcadas e recuperadas por raspagem da sílica, e em seguida extraídas com diclorometano e filtradas. Os compostos obtidos, aparentemente puros em CCD, foram avaliados por CG-EM.

A mistura de taraxasterol e 9-hexacoseno (Figuras 16 e 17, respectivamente) foi identificada após a análise dos dados obtidos por CG-EM (Figura 17). A análise foi feita por comparação com a base de dados Wiley 275.

A fórmula molecular do taraxasterol (SG5.2) é  $C_{30}H_{50}O$ , de nomenclatura sistemática (3 $\beta$ ,18 $\alpha$ ,19 $\alpha$ )-urs-20(30)-en-3-ol e massa molecular de 426.7174 g/mol; e do 9-hexacoseno (SG5.2) é  $C_{26}H_{52}$  de nomenclatura sistemática (9E)-9-Hexacoseno e massa molecular de 364.69 g/mol (Figura 18).

O subgrupo (SG5.3) ainda está em fase de identificação.

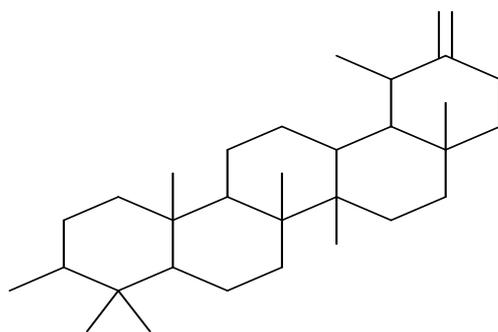


Figura 16. Estrutura química de Taraxasterol



Figura 17. Estrutura química de 9-Hexacoseno

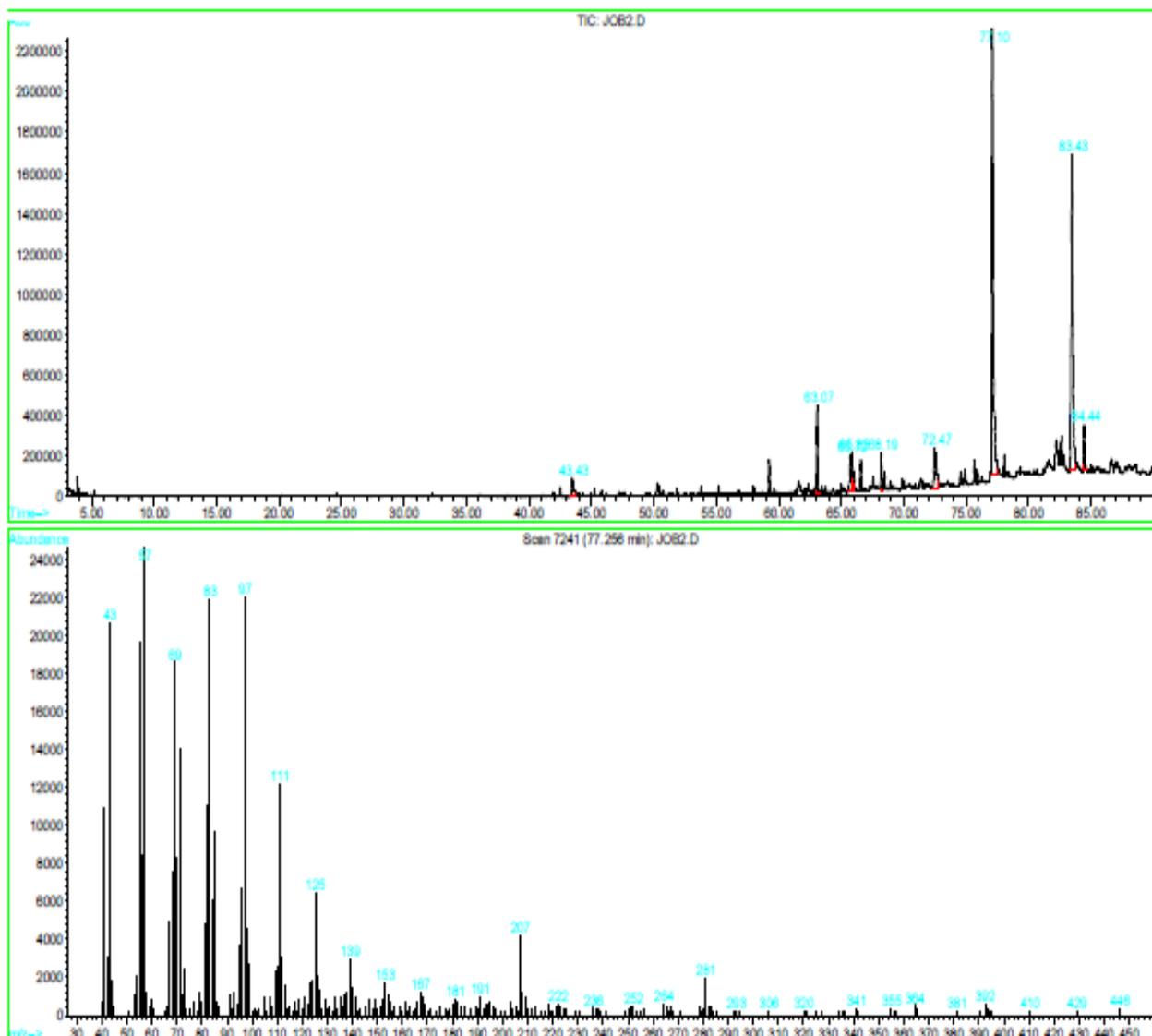


Figura 18. Espectro CG-EM referente a mistura Taraxasterol+9-Hexacoseno (SG5.2). Eixo x=razão massa/carga e eixo y=abundância.

Taraxasterol foi isolado pela primeira vez da erva *Taraxacum officinale* espécie vegetal popularmente usada para doenças inflamatórias. Esta substância inibiu a produção de óxido nítrico (NO) indizado por lipopolissacarídeo (LPS) e a produção de prostaglandina E2 (PGE2) em células RAW 264.7 de macrófagos. O taraxasterol inibiu os níveis de mRNA e da expressão da proteína iNOS e COX-2 em processos inflamatórios (Huanzhang Xiong *et al.*, 2014). Outras atividades farmacológicas também foram relatadas na literatura como: indução apoptótica, potencial antimicrobial, anticarcinogênico, antialérgico,

antioxidante e anti-inflamatório. (Jamshieed, S. 2010, Choi, U. K. *et al.*, 2010, Liu, J. *et al.*, 2013)

Seguindo a purificação dos grupos químicos, os subgrupos **SG-5.7, SG-5.8 e SG-5.9 (430 mg)** foram reunidos e purificados em cromatografia de coluna aberta de sílica gel, em uma coluna de diâmetro de 2,5mm e 27 g de sílica, utilizando um gradiente ciclohexano/acetato de etila, variando entre 97:3 a 80:20. Foram obtidas 437 frações agrupadas em 12 sub-grupos, conforme perfil cromatográfico em CCD (tabela 3).

Tabela 3. Fracionamento dos Subgrupos 5.7, 5.8 e 5.9 do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum*

Subgrupos	Subfração	Eluente	Massa(gramas)/Rendimento (%)
5.7-9.1	1-30	Ciclohexano:97 Acetato:3	0,0396/8,8
5.7-9.2	31-59	Ciclohexano:97 Acetato:3	0,030/6,8
5.7-9.3	60-119	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0213/4,7
5.7-9.4	120-174	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0323/7,2
5.7-9.5	175-194	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0419/9,3
5.7-9.6	195-208	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0348/7,7
5.7-9.7	209-240	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0327/7,2
5.7-9.8	241-261	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0401/8,9
5.7-9.9	262-289	Ciclohexano:96 Acetato:4	0,0112/2,5
5.7-9.10	290-300	Ciclohexano:93 Acetato:7	0,0499/11,1
5.7-9.11	301-362	Ciclohexano:93 Acetato:7	0,0380/8,4
5.7-9.12	363-437	Ciclohexano:80 Acetato:20	0,0672/14,9

O **subgrupo 10** foi submetido a RMN 1D e após comparação com dados da literatura foi identificado como sendo o ácido betulínico (Figura 19). Os dados obtidos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  encontram-se na tabela 4, e o espectro de hidrogênio e carbono estão ilustrados nas figuras 20 e 21. A fórmula molecular do ácido betulínico (SG5. 7-9.10) é  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ , de nomenclatura sistemática 3 $\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico e massa molecular de 456,70 g/mol.

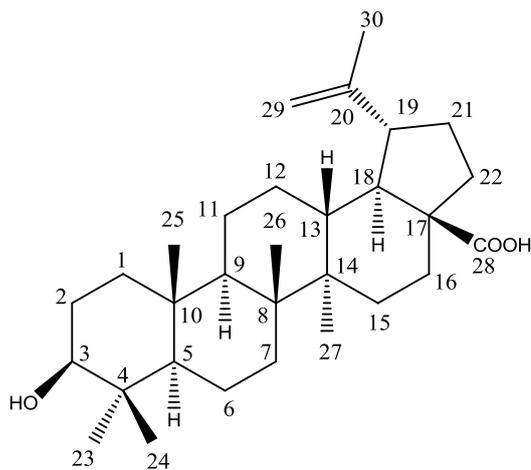


Figura 19. Estrutura química do Ácido betulínico (SG5. 7-9.10).

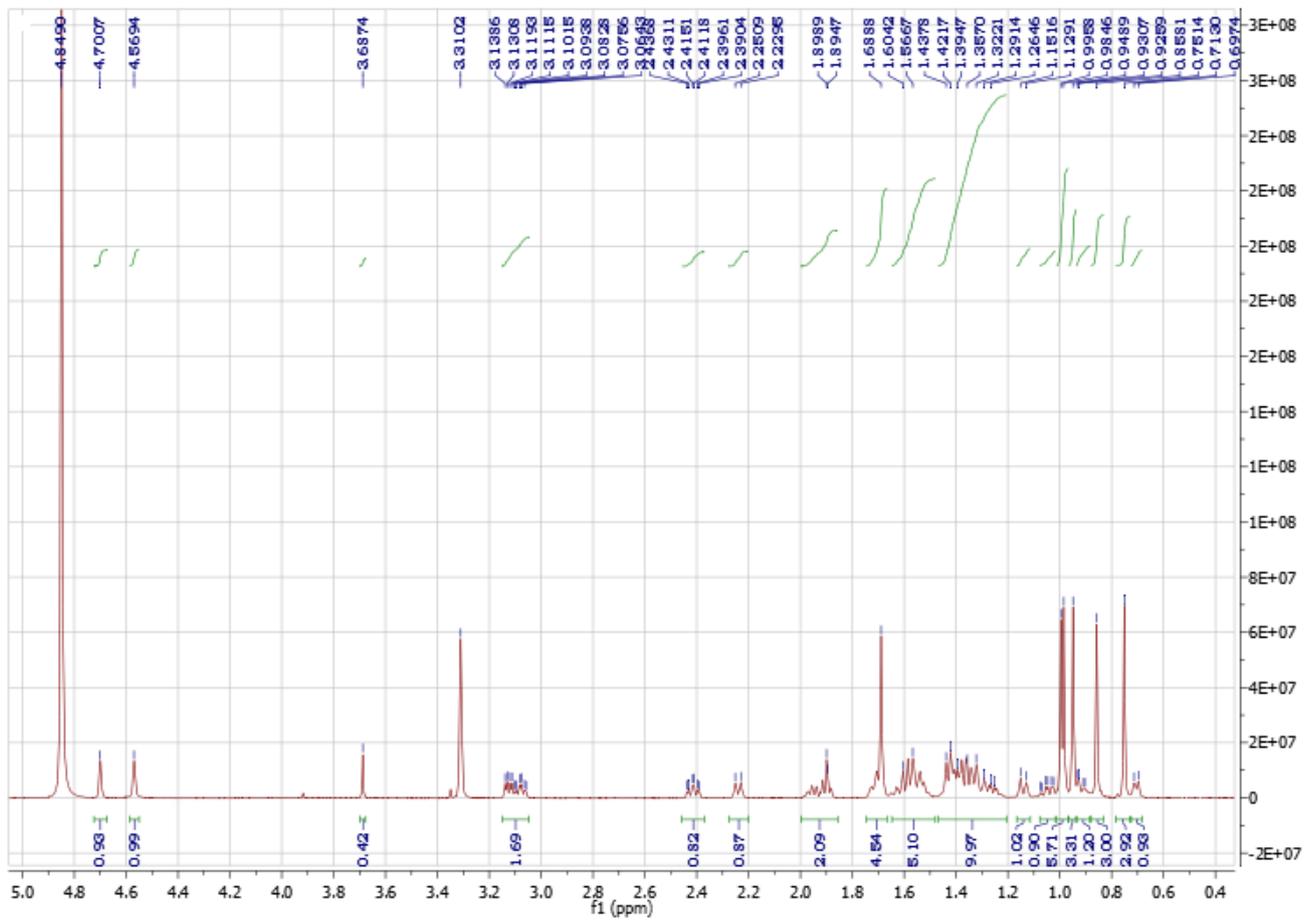


Figura 20. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido betulínico (SG5.7-9.10) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 600 MHz.

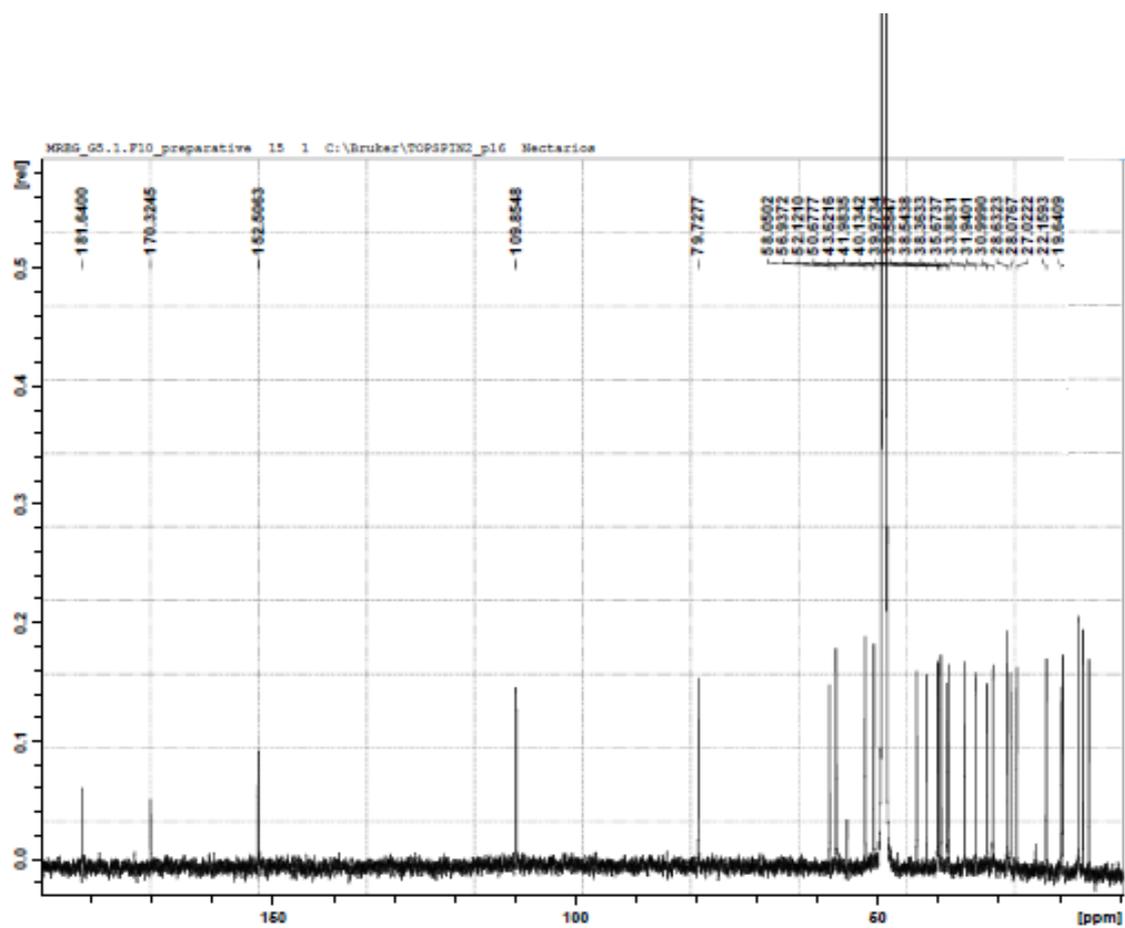


Figura 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido betulínico (SG5.7-9.10) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 600 MHz.

Tabela 4. Valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ 

<b>POSIÇÃO</b>	<b><math>^1\text{H}</math>, <math>\delta</math> (ppm), <math>J</math> (Hz) <u>600MHz, MeOD</u></b>	<b><math>^{13}\text{C}</math>, <math>\delta</math> (ppm) <u>150 MHz, MeOD</u></b>
1		40.1
2	1.87-1.98 (m, 2H)	31.9
3		79.7
4		40.1
5	0.70 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz)	58.1
6		27.0
7		38.6
8		42.0
9		56.9
10		39.6
11		28.6
12		31.0
13		40.0
14		43.6
15		35.7
16		38.4
17		58.1
18	0.92 (dd, 1H, $J = 2.9, 4.0, 13.5$ Hz)	50.7
19	2.41 (td, 1H, $J = 2.0, 3.4, 12.4$ Hz)	52.1
20		152.5
22		39.6
23	0.99 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, 23, 26- <b>CH<sub>3</sub></b> )	31.9
24	0.75 (s, 3H)	22.2
25	0.86 (s, 3H)	22.2
26	0.99 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, 23, 26- <b>CH<sub>3</sub></b> )	22.2
27	0.95 (s, 3H)	19.6
28		181.6
29a	4.57 (s, 1H)	109.9
29b	4.70 (s, 1H)	109.9
30	1.69 (s, 3H)	28.1

Ácido betulínico é uma substância natural do tipo triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano, que apresenta diferentes atividades biológicas, incluindo propriedades citotóxicas. Estudos descrevem os efeitos antitumorais do ácido betulínico contra um amplo espectro de células cancerígenas, tais como melanoma, pescoço e cabeça, ovário, mama, pulmão, tireoide, cervical, cólon, lipossarcoma, sendo que ele atua em concentrações micromolares com maior seletividade para essas células, pois não demonstra atividade citotóxica em células normais (Zuco *et al.*, 2002; Baratto *et al.*, 2013) O ácido betulínico em outros estudos ainda demonstrou atividades como: antimalárico, anti-inflamatório, anti-helmíntico, anti-HIV (Zuco *et al.*, 2002; Dantas, 2012).

O grupo G13 (F130-F134) (255 mg) foi submetido à análise em HPLC - utilizando catequina e epicatequina como padrões, e observados os tempos de retenção e análise em PDA (Figura 22), ainda foi realizada análise em espectroscopia de massa (Figura 23) e em RMN 1D (Figura 24).

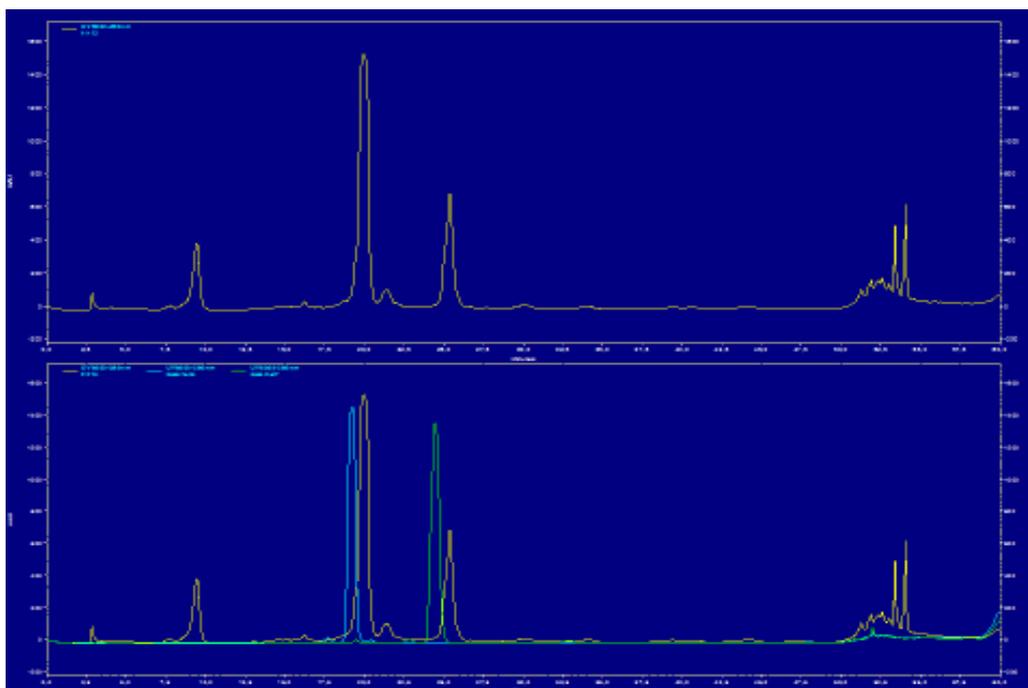


Figura 22. Espectro HPLC do grupo G13 (F130-F134), oriundo do fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*, com os padrões catequina e epicatequina. Eixo y= absorvância/eixo x= tempo de retenção. O pico em azul = Catequina; verde = epicatequina; amarelo = G13.

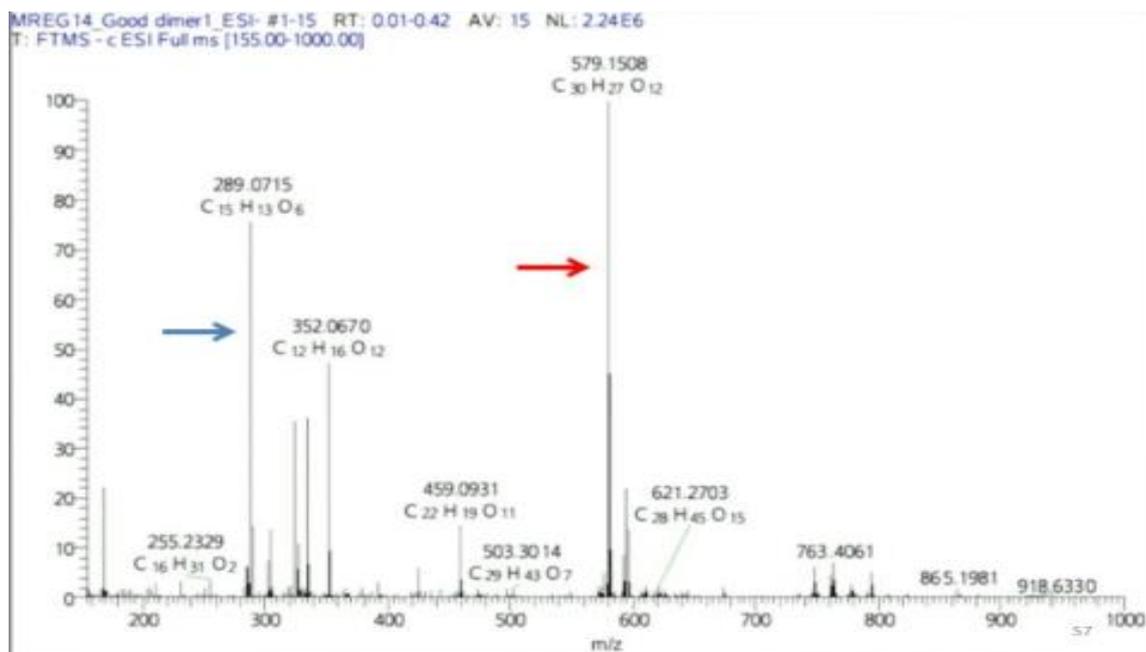


Figura 23. Espectro de massa da catequina (seta azul) e dímero de catequina (seta vermelha).

Os dados da espectroscopia de massa revelaram  $m/z$  de 289,0715  $[M+H]^+$ , que é referente ao valor da massa da catequina; e  $m/z$  de 579,1508  $[M+H]^+$ , que é referente à massa de um dímero de catequina (Figura 22) conforme valores descritos na literatura (Sandhu, 2010)

O espectro de hidrogênio (Figura 23) e os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 5) foram consistentes com aqueles relatados na literatura para a estrutura proposta confirmando que realmente se trata do composto catequina (Figura 25).

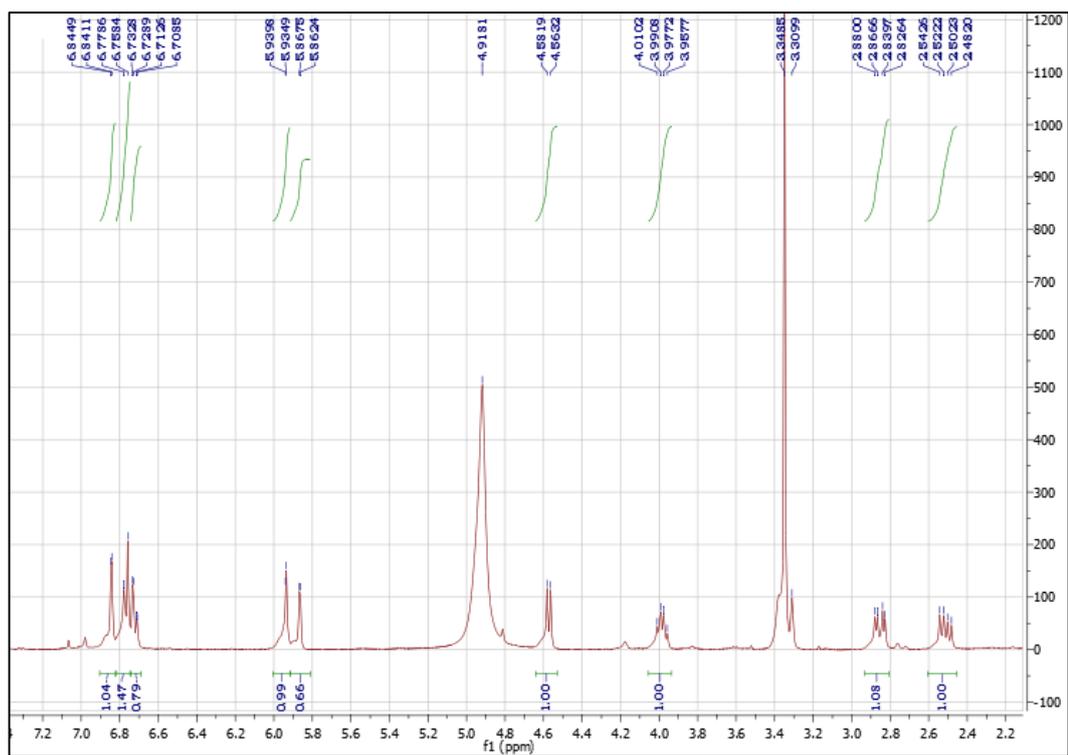


Figura 24. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  referente à mistura catequina e dímero de catequina (G13) em  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 600 MHz.

Tabela 5. Valores dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para G13 – catequina e dímero de catequina, e comparados com dados da literatura

POSIÇÃO	$^1\text{H}$ G13, $\delta$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}$ G13, $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ Ayres et al 2009, $\delta$ (ppm)
2	4.59 (d, 1H, J = 7.5Hz)	82.4	82.6
3	4.0 (m, 1H)	68.3	68.2
4ax	2.53 (dd, 1H, J = 8.1 Hz, J = 16.1 Hz)		
4eq	2.87 (dd, 1H, J = 5.3 Hz, J = 16.1 Hz)	28.0	28.0
6	5.88 (d, 1H, J = 2.0 Hz)	96.4	96.4
7			157.4
8	5.96 (d, 1H, J $\cong$ 2.0 Hz)	95.5	95.6
9			156.7
10			100.9
1'			132.0
2'	6.86 (d, 1H, J = 1.5 Hz)	114.3	115.2
3'			146
5'	6.79 (d, 1H, J = 8.0 Hz)	115.2	116.2
6'	6.74 (dd, 1H, J = 8.1 Hz, J = 1.5 Hz)	119.9	120.1

A fórmula molecular da catequina (G13) é  $C_{15}H_{14}O_6$ , de nomenclatura sistemática (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol e massa molecular de 290.24 g/mol.

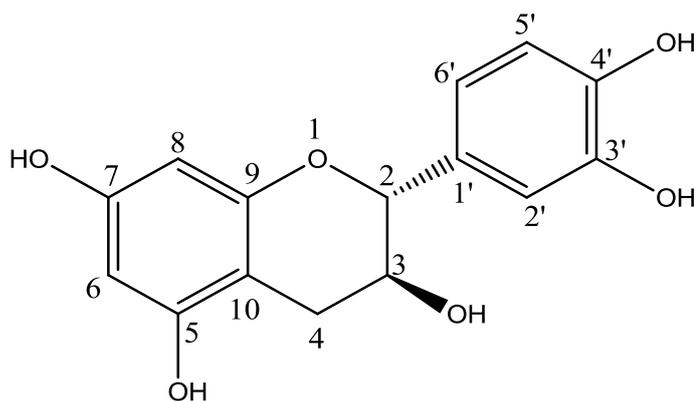


Figura 25. Estrutura química da catequina

A catequina faz parte do grupo dos flavonoides. Dentre os compostos fenólicos temos os derivados flavânicos (flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis) que podem se polimerizar originando taninos, sendo o representante mais importante do grupo dos flavan-3-óis, a catequina. Esta substância exibe ação antiviral, antioxidante e antitrombótica (Neiva *et al.*, 2003). As catequinas também apresentam atividades quimioprotetora, anti-inflamatória e anticarcinogênica (Schmitz *et al.*, 2005; Silva, 2014), e ainda demonstrou atividade em bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* (Silva, 2013).

### 5.3 Atividade farmacológica do extrato e compostos isolados de *E. ellipticum*

#### 5.3.1 Análise dos ensaios *in vitro* em cepa e isolados clínicos de *Trichophyton* spp.

Em nosso trabalho foi estabelecido como critério valor de CIM  $\leq 125$   $\mu\text{g/mL}$  para que o extrato fosse considerado promissor (Albernaz *et al.*, 2010). O extrato bruto havia sido testado anteriormente em outro trabalho do laboratório de Farmacognosia/UnB (Santana, 2013), em duas espécies de fungos filamentosos, *T. mentagrophytes* LMGO 09 e em *T. rubrum* LMGO 06, e apresentou um CIM de 125 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Após isolamento dos compostos, lupenona, ácido betulínico e catequina + dímero, estes foram avaliados nas cepas já citadas e ainda em *T. mentagrophytes* ATCC 9533 cedida pela FIOCRUZ. Os resultados podem ser visualizados na tabela 6 abaixo. As cepas denominadas LMGO (Laboratório de Micologia de Goiás) correspondem aos isolados clínicos de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, cedidos pela Profa. Maria do Rosário Rodrigues Silva/UFG.

Tabela 6. Atividade dos compostos isolados do extrato da casca do caule de *E. ellipticum* em fungos filamentosos (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ )

Amostras	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	<i>T. rubrum</i> LMGO 06
Lupenona	–	–	–
Ácido betulínico	–	–	–
Catequina + dímero	500	125	–
Anfotericina B	1	4	1
Itraconazol	8	16	16
Fluconazol	32	8	4

– não ativo

As análises do potencial antifúngico dos compostos isolados de *E. ellipticum* demonstraram que catequina + dímero de catequina foi ativa em *T.*

*mentagrophytes* ATCC com um CIM de 125 µg/mL (Tabela 6). Os demais compostos isolados não foram considerados ativos de acordo com o padrão proposto. Considerando a distribuição geográfica, na América as espécies mais frequentemente encontradas são *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os tratamentos disponíveis são prolongados, tornando as falhas terapêuticas recorrentes. Assim, o resultado encontrado contribui para a busca de tratamentos mais eficazes (Grannoum *et al.*, 2013).

A catequina é um flavonoide e a ação antimicrobiana desta classe de compostos pode estar relacionada com a capacidade de se ligarem às proteínas extracelulares solúveis, e com estruturas da parede celular. A maioria dos flavonoides podem atuar causando a ruptura das membranas microbianas (Girarde *et al.*, 2014).

Inspirados no uso clínico da anfotericina B para o tratamento de infecções fúngicas e leishmanioses (Santana, 2013), a atividade dos compostos isolados do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* foram avaliados em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

### **5.3.2 Análise dos ensaios *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* transfectadas com GFP**

O extrato bruto e os compostos isolados foram testados em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* transfectadas com GFP. O grupo G13, identificado como sendo catequina + dímero de catequina, apresentou atividade leishmanicida com valor de IC<sub>50</sub> de 9,7 µg/mL, e a lupenona (G2) de 43,9 µg/mL. O ácido betulínico (SG5.7-9.10) não apresentou atividade na maior concentração testada (100 µg/mL). O controle positivo anfotericina B apresentou valor de IC<sub>50</sub> de 0,2 µg/mL em *Leishmania amazonensis* GFP.

#### **5.3.2.1 Curva de crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP com e sem tratamento**

Para avaliar se o tratamento influenciaria na curva de crescimento do parasito escolhemos o extrato bruto e o grupo G13 (catequina + dímero de catequina), por apresentar um IC<sub>50</sub> de 9,23 µg/mL e 9,7 µg/mL, respectivamente. As amostras avaliadas foram denominadas: GFP, GFP+DMSO, GFP+G13 e GFP+Extrato. A fase logarítmica foi detectada pela intensa proliferação entre um e cinco dias da cultura. A partir do 5<sup>o</sup> dia de cultura, a proliferação dos parasitos diminuiu, iniciando a fase estacionária, que é a fase infectante. O máximo de parasitos na cultura variou de 10 - 20 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL.

A análise da curva de crescimento dos parasitos *in vitro* mostrou similaridade no crescimento entre GFP e o controle negativo GFP+DMSO, não se observando diferenças significantes entre os perfis das curvas de crescimento ou entre as quantidades de parasitos obtidos nas culturas. Porém, quando analisado o crescimento na presença das amostras, a quantidade de parasitos diminuiu expressivamente na presença do grupo G13, e do extrato bruto, mostrando que houve uma queda de metade dos parasitos, quando comparado aos controles negativos. Esses resultados corroboram com resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa em testes de atividade do mesmo extrato em *Leishmania* não transfectadas (Santana, 2013), e ainda com a descrição da catequina na literatura (Cruz *et al.*, 2013) (Figura 26).

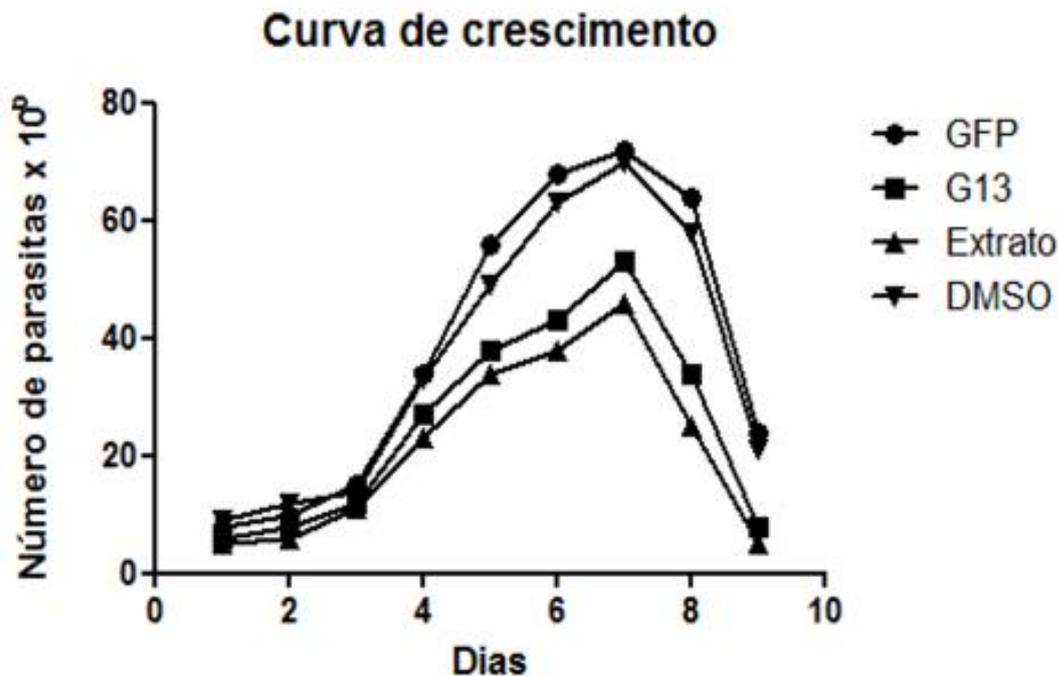


Figura 26. Curva de crescimento *in vitro* do GFP, GFP+DMSO, GFP+G13 e GFP+Extrato. Os parasitos foram cultivados na concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL em meio Schneider completo (com SFB e antibiotico), a 26 °C. A quantificação dos parasitos foi realizada pela contagem diária, sob microscopia de luz, em hematocítômetro. Os dados representam as médias  $\pm$  DP de três curvas independentes.

Segundo Stankov *et al.* (2010), durante o ensaio da curva de crescimento para *Leishmania*, o terceiro dia corresponde a fase procíclica, onde existe o menor potencial infectante para o hospedeiro vertebrado, comparada ao sexto dia que é a fase tetracíclica. Isto se explica pelo fato de que a fase procíclica ou fase de crescimento logarítmico, que é um momento de intensa atividade metabólica. E o sexto dia de cultivo é ideal para realização dos estudos *in vitro*, pois nesse dia a cultura de leishmanias está enriquecida de formas metacíclicas.

### 5.3.3 Obtenção das formas amastigotas axênicas

Com o objetivo de compreender a cinética da transformação das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP em amastigotas axênicas, e para determinar o tempo de aquisição de 100% de amastigotas esféricas fizemos uma contagem durante 7 dias, o que originou uma curva quantitativa de transformação (Figura 27). As formas promastigotas foram mantidas à 26 °C em meio Schneider até atingirem a fase log de crescimento. Em seguida, a cultura foi incubada por 96 h a 34 °C, até a aquisição das formas amastigotas.

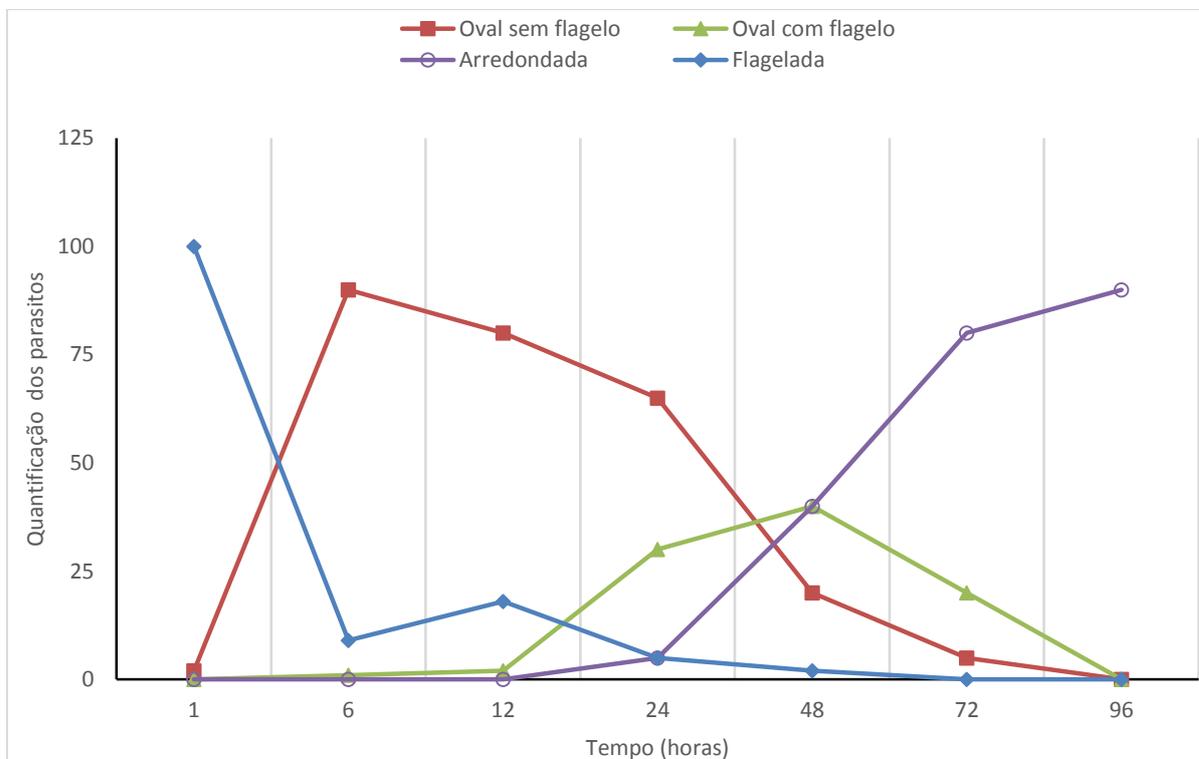


Figura 27. Obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas com GFP em função do tempo. Amostras dos cultivos foram contadas nos tempos de 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h.

Para se transformarem em amastigotas axênicas, primeiramente as formas promastigotas, mudam sua forma de alongada para oval e continuam com flagelo, em seguida, perdem seu flagelo, continuando ovais e posteriormente, adquirem uma forma esférica, característica da forma amastigota. Os resultados das análises quantitativas das culturas avaliadas mostraram que as formas

promastigotas diminuem em função do tempo. Em 48 h, as formas promastigotas perdem o flagelo, e após 96 h tem-se 100% de formas amastigotas (Tabela 7).

Tabela 7. Percentual de formas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas com GFP incubadas a 34 °C em função do tempo.

TEMPO (H)	FLAGELADA (%)	OVAL FLAGELADA (%)	OVAL NÃO FLAGELADA (%)	ARREDONDADA (%)
1	100	0	0	0
6	9	90	1	0
12	18	80	2	0
24	5	60	30	5
48	2	20	40	40
72	0	5	20	80
96	0	0	0	90

Doyle e colaboradores (1991) foram os primeiros a transformar com sucesso formas promastigotas em amastigotas axênicas, utilizando uma cepa de *Leishmania donovani*. Desde então, diversos laboratórios obtiveram sucesso na produção de amastigotas axênicas, utilizando elevação da temperatura, combinação com pH ácido e uso de diferentes meios de cultura. Entretanto, as condições que promovem a transformação de promastigotas em amastigotas axênicas em uma dada espécie, podem não ser apropriadas para outra. Por isso, as condições de cultivo devem ser determinadas para cada espécie ou cepa de *Leishmania* (Coelho-Finamore *et al.*, 2011).

Também foi avaliada a capacidade celular das amastigotas axênicas em se diferenciar em formas promastigotas. As amastigotas axênicas foram colocadas em meio e temperatura ideal para formas promastigotas e no quarto dia da cultura foi possível perceber que grande parte dos parasitos já tinham voltado para a forma promastigota. Na figura 28B é possível visualizar as formas promastigotas após a transformação, que apresenta o corpo alongado e flagelo

livre, diferente da forma amastigota de corpo ovóide e flagelo interno e sem movimentos (Figura 28A).

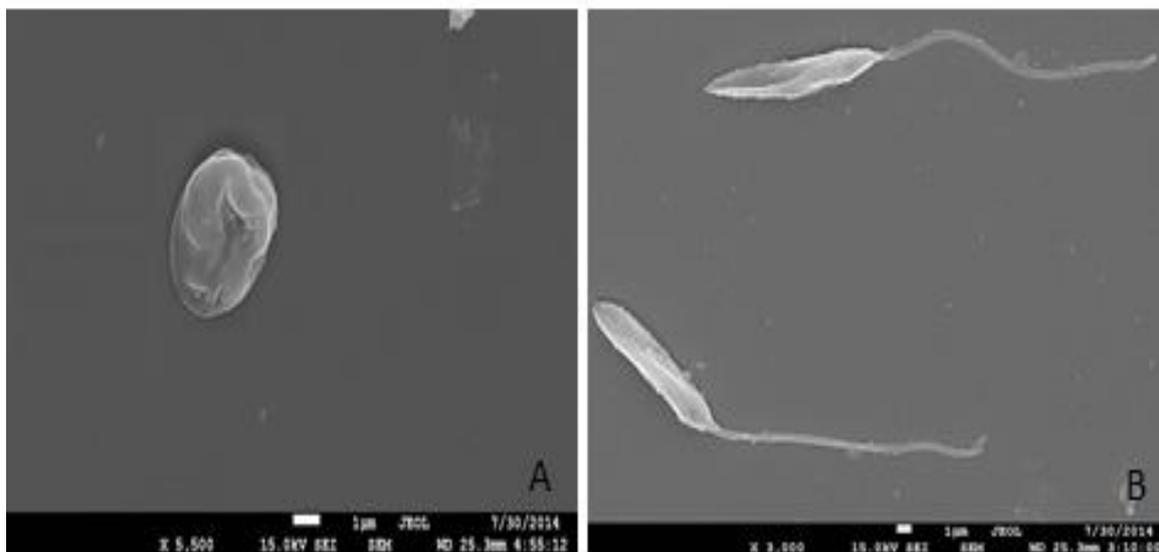


Figura 28. Fotografias em microscópio eletrônico de varredura: A – forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* GFP e B - forma promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* GFP.

#### 5.3.4 Avaliação da toxicidade do extrato e da catequina em macrófagos murinos

Foi avaliado a viabilidade celular de macrófagos 48 h após o tratamento com o extrato bruto e com a catequina. Foi observado que a catequina diminuiu a viabilidade dos macrófagos nas dosagens testadas conforme as concentrações eram aumentadas de 5 a 200  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* apresentou uma diminuição de células viáveis. Na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  houve uma diminuição de 60 % das células viáveis e na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  observou-se 80% de viabilidade celular e apresentando  $\text{IC}_{50}$  de  $65,00 \pm 30,50 \mu\text{g/mL}$  (Figura 29). Para a concentração de  $\text{IC}_{50}$  de 9,23  $\mu\text{g/mL}$  do extrato bruto, não houve diminuição em torno de 20% da viabilidade do macrófago, o que foi considerado não citotóxico.

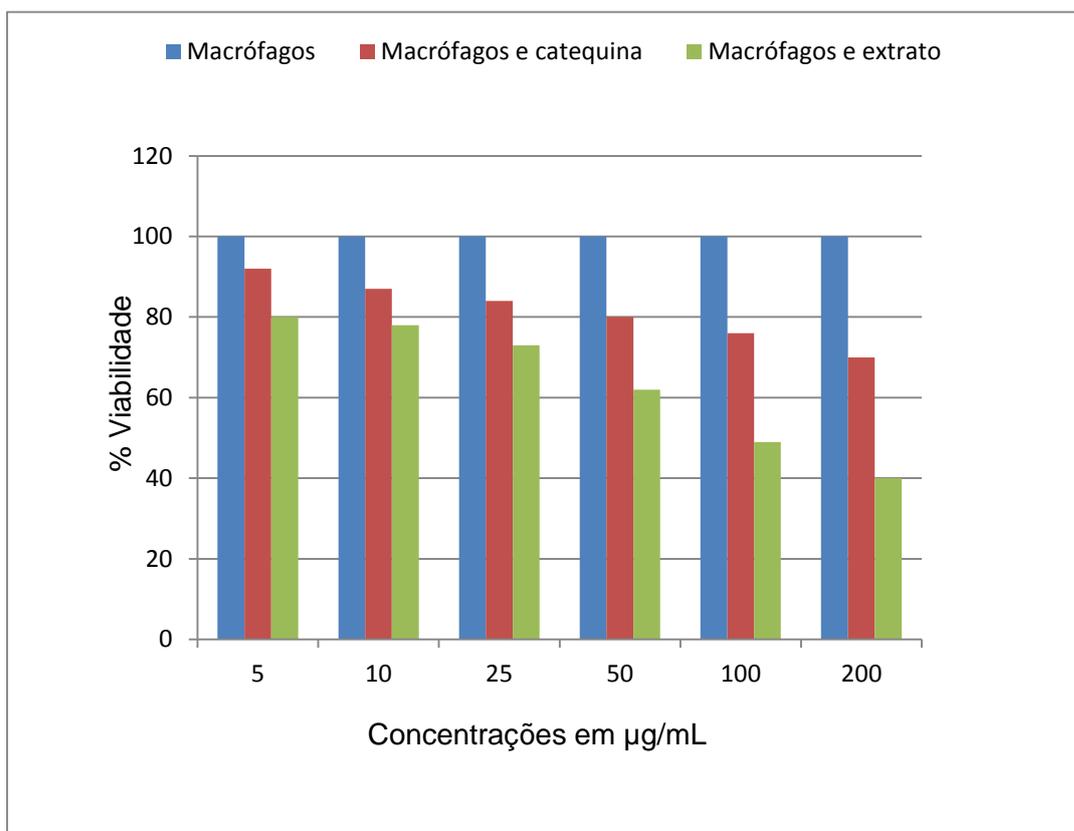


Figura 29. Valores de viabilidade celular observados em macrófagos murinos Balb/C após 48 h de tratamento. Média de três experimentos  $p < 0,05$ .

Bonacorsi (2009) avaliou a catequina em células McCoy que são fibroblastos (linhagem contínua) de camundongos, e verificou a não toxicidade desta substância, que apresentou um  $IC_{50}$  de  $164,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ . A literatura descreve compostos isolados de espécies do gênero *Enterolobium*, e testados para avaliação da sua citotoxicidade em macrófagos, como os triterpenos isolados de *E. contortisiliquum*, onde a enterolosaponina B não demonstrou atividade citotóxica, e a enterolosaponina A mostrou atividade altamente seletiva em macrófagos BAC1.2F5 (Bonel-Raposoet al., 2008). Nossos resultados sugerem que a citotoxicidade apresentada pelo extrato bruto não necessariamente é causada somente por uma, mas provavelmente pela associação de compostos presentes no extrato.

### **5.3.5 Análise da atividade em formas amastigotas**

#### **5.3.5.1 Atividade em formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP - Tratamento antes e após infecção de macrófagos**

A fim de analisar se os tratamentos propostos tinham atividade com a infecção em curso ou no pré tratamento e os prováveis mecanismos de ação. Avaliamos se os tratamentos propostos participariam da ativação dos macrófagos em sua defesa, ou se os tratamentos resultariam em uma diminuição da infecção no ensaio realizado com a infecção já em curso. Realizamos então dois experimentos:

Em um dos ensaios, a fim de analisar a atividade do extrato ou da catequina na infecção, o tratamento foi realizado 48 h após a infecção. Após 72 h, tempo utilizado para avaliação do tratamento, o extrato apresentou uma boa atividade, diminuindo a infecção em 73,7%, enquanto a catequina diminuiu a infecção em 43,3%. O controle positivo Anfotericina B diminuiu a infecção em 59% (Figura 30). O extrato bruto, portanto teve uma atividade melhor que o apresentado pelo tratamento utilizado hoje pela clínica.

## Tratamento pós infecção

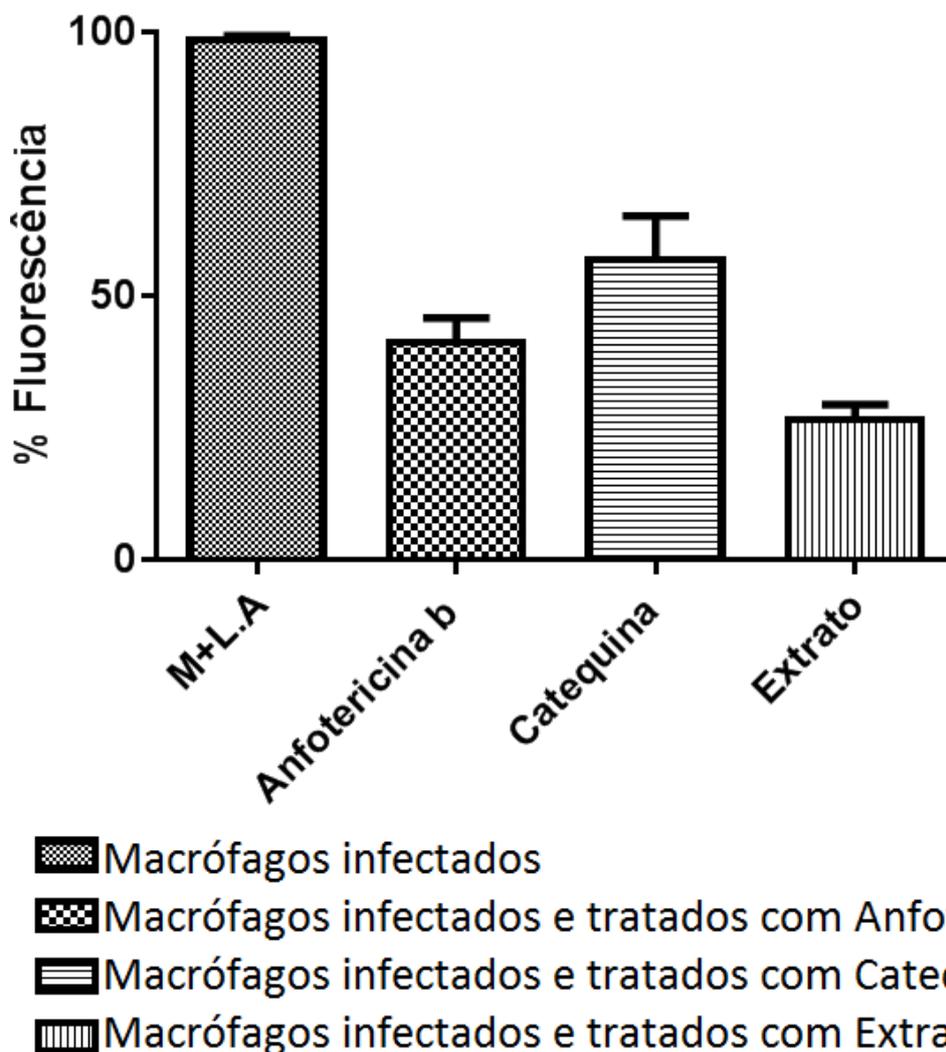


Figura 30. Análise do efeito do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* e o grupo G13 em formas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP, 72 h após a infecção. Anfotericina B foi utilizada como controle positivo e os macrófagos infectados e não tratados foram o controle negativo.

A figura 31, obtida em microscópio de luz permitiu comparar a cultura de macrófagos infectada, que não recebeu nenhum tratamento (Figura 31 A), com formas amastigotas apresentando morfologia normal, arredondadas e com núcleo justaposto ao cinetoplasto. Enquanto a cultura que recebeu algum dos tratamento (Figuras 31 B e 31 C) mostra alterações morfológicas como: vacuolização citoplasmática múltipla e alterações na membrana plasmática,

evidenciando a morte dos parasitos. A mistura catequina e dímero de catequina (grupo G13) (Figura 31 C) ainda reduziu o volume citoplasmático e o número de parasitos inseridos no vacúolo parasitóforo em relação ao controle negativo (Figura 31 A).

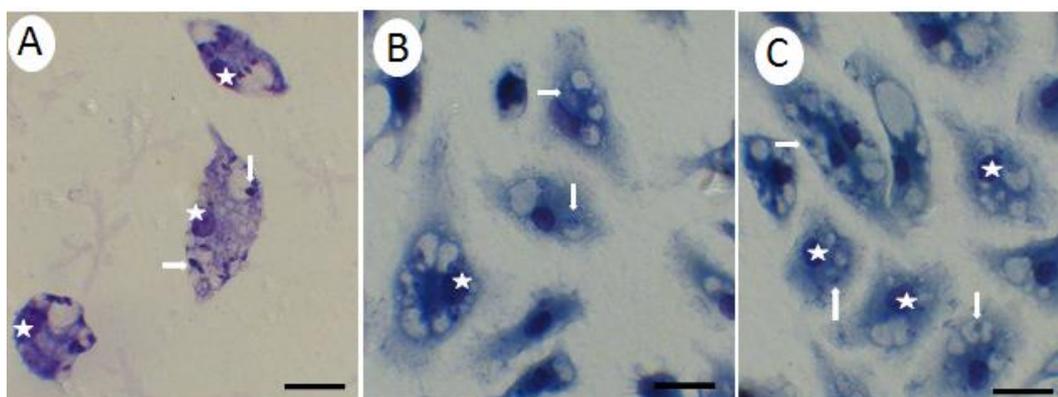


Figura 31. Fotomicrografia obtido em microscópio optico do tratamento feito após 48 h da infecção de macrófagos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP. A. Macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* GFP sem tratamento; B. Macrófagos infectados e tratados com extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*. C. Macrófagos infectados e tratados com a catequina. Setas indicam a presença do parasito e estrela o núcleo do macrófago. Aumento de 100x.

A catequina é um flavonoide, e de acordo com os estudos realizados por Tasdemir e colaboradores (2006), esta classe de compostos apresenta atividade leishmanicida. Estes autores observaram que a quercetina tem potente atividade antiprotozoária, e que a maioria dos compostos com esta atividade têm estrutura típica de flavona e/ou uma subestrutura de catecol. Observaram ainda que, a metilação dos grupos OH destas moléculas, reduz significativamente a atividade leishmanicida. Cruz (2013) verificou que a catequina inibe em 66% da arginase, que é um composto de manganésio metaloenzimas, que catalisa a hidrólise da L-arginina para L-ornitina e uréia. A ornitina quando descarboxilada

em putrescina, o precursor de diamina das poliaminas (PA), mostra-se envolvida em diferentes mecanismos necessários para a proliferação celular, e é, portanto, uma alvo valioso para o tratamento quimioterápico (Birkholtz *et al.*, 2011).

No outro ensaio, a fim de analisar a atividade do extrato e da catequina na instalação da infecção, o tratamento foi iniciado 48 h antes da infecção.. Para verificar se o pré-tratamento dos macrófagos alteraria sua morfologia, estes receberam uma concentração de 9,23 µg/mL do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*, ou uma uma concentração de 9,7 µg/mL da mistura catequina. Como controle negativo foi feita a cultura dos macrófagos na presença de DMSO (0,1%). Como pode ser observado na Figura 32, o extrato diminuiu a infecção em 60% e a mistura em 27,5% e Anfotericina b 38%, mostrando assim que o extrato induz de alguma forma o macrófago na sua defesa. Esses resultados permitiram sugerir que o extrato intensificou os mecanismos microbicidas dos macrófagos, levando à morte da *Leishmania*.

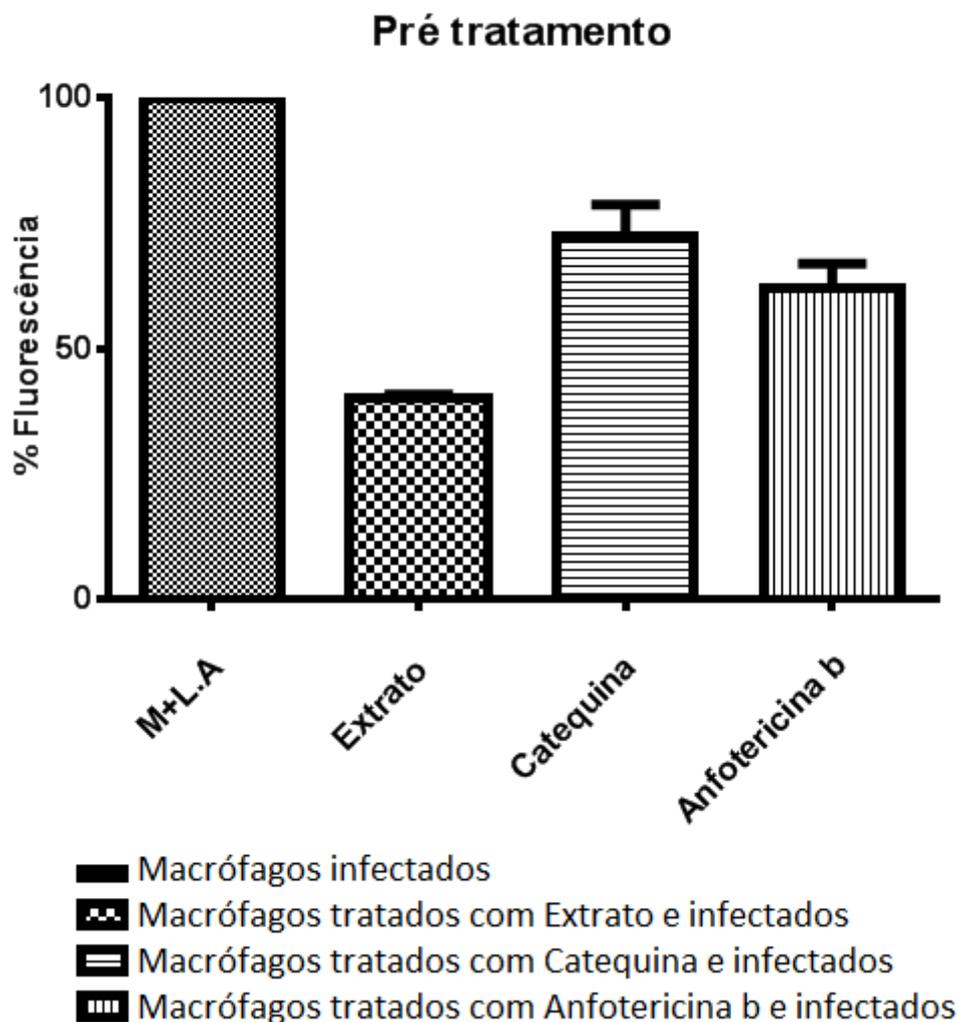


Figura 32. Efeito do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* e da mistura catequina e dímero de catequina (grupo G13) como pré-tratamento de macrófagos 48 h antes da infecção com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* transfectada com GFP.

Os mecanismos pelos quais o extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* exerce seu efeito leishmanicida não estão esclarecidos. O efeito pode ser devido à ativação de macrófagos, pois se sabe que estes estão envolvidos em muitas funções, como fagocitose, liberação de enzimas, geração de radicais livres e mediadores de processos inflamatórios, ou ainda devido à ação da catequina, presente no extrato como inibidora da arginase, pois, a *Leishmania* deficiente em arginase é incapaz de produzir poliaminas, que são

essenciais para a proliferação, diferenciação e síntese de macromoléculas (Cruz *et al.*, 2013).

### **5.3.6 Alterações morfológicas em formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP**

Analizamos as alterações morfológicas das formas amastigotas axênicas tratadas com o extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*, e com a catequina, durante 24, 48 e 72 h.

As alterações superficiais observadas a partir da análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 33) mostram as formas amastigotas não-tratadas (controle) sem alterações visíveis (Figuras 33A, 33D e 33G). Entretanto, quando foi feito o tratamento com extrato por 24 h, foram visualizadas diferenças na morfologia (Figura 33C), que foram se intensificando com o passar do tempo, apresentando poros e intumescimento da membrana do parasito (Figura 33F). E no tempo de 72 h foi possível observar a perda quase que completa da sua morfologia (Figura 33I).

Embora o tratamento com a catequina não tenha mostrado diferença morfológica, no tempo de 24 h (Figura 33B), quando comparada com o controle negativo apresentou uma diferença significativa à partir de 48 h (Figura 33E) e 72 h (Figura 33H), apresentando alterações na membrana (Figura 33 - setas vermelhas) e presença de poros (Figura 33 - setas azuis).

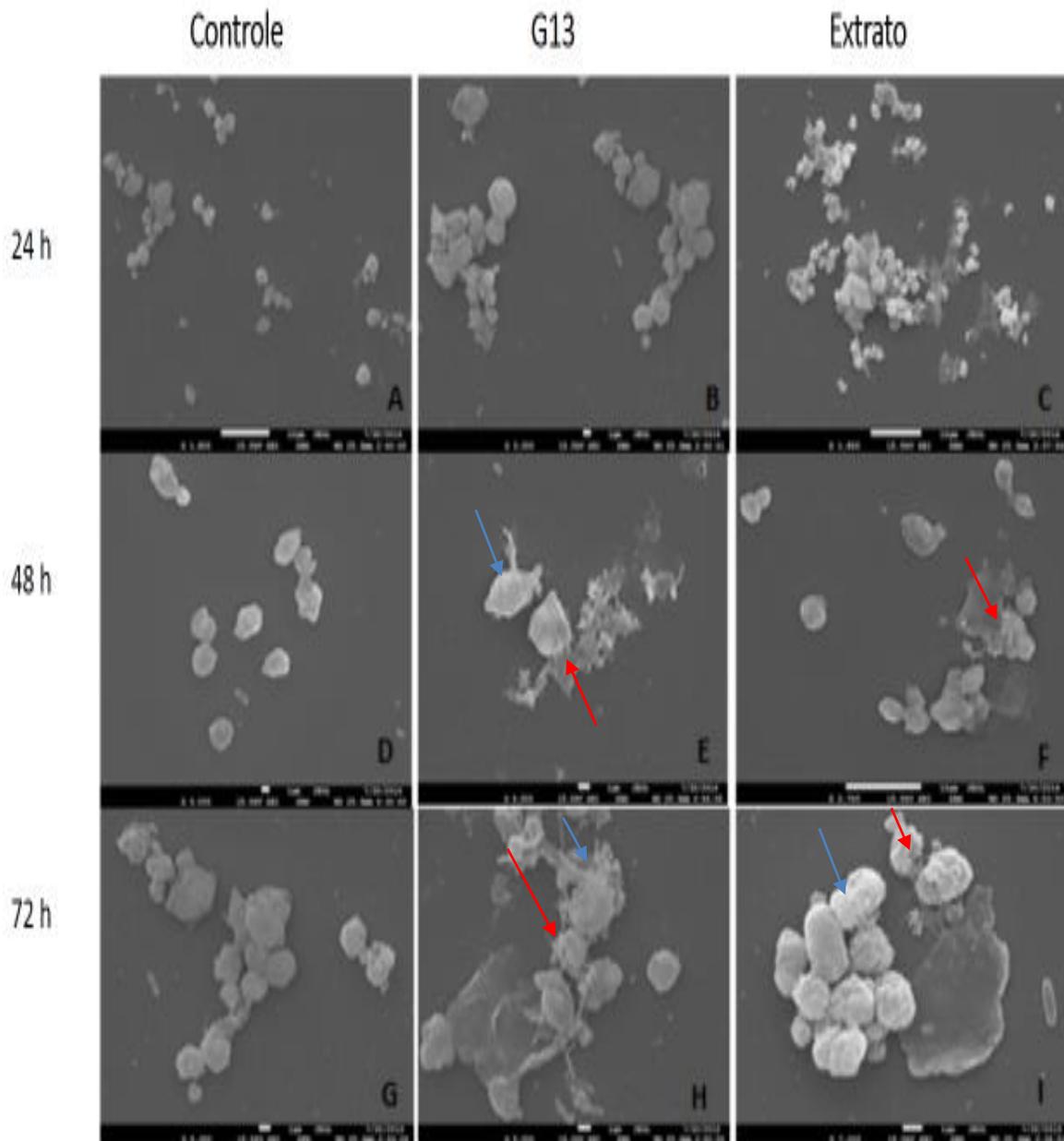


Figura 32. Fotografias em microscopia eletrônica de varredura - formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* GFP tratadas durante 24, 48 e 72 h: controle - apenas formas amastigotas (A, D e G); catequina (B, E e H); extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* (C, F e I). Setas azuis = presença de poros. Setas vermelhas = alterações na membrana.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura permitiu constatar que o tratamento das formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* GFP com o extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*, ou a catequina

demonstrou ter um efeito sobre a membrana celular do parasito. Foram observadas alterações no tamanho, na forma e na estrutura do protozoário, quando comparadas com o controle.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos no trabalho em realizar o estudo fitoquímico do extrato acetato de etila da casca do caule de *Enterolobium ellipticum* Benth (Fabaceae) e investigar a atividade em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em fungos dermatófitos, é possível fazer as seguintes considerações:

1. O estudo fitoquímico apontou a presença de terpenos e flavonoides: foi identificado o triterpeno lupenona (G2); uma mistura com o triterpeno taraxasterol e o hidrocarboneto 9-hexacosene (SG5.2) e o triterpeno ácido betulínico (SG5.7-9.10), ambos à partir do grupo G5; uma mistura de flavonoides catequina e dímero de catequina (G13).

2. A análise do potencial antifúngico dos compostos isolados de *E. ellipticum* demonstrou que a catequina foi ativa em *T. mentagrophytes* ATCC 9533 com um CIM de 125 µg/mL. Os demais compostos isolados não foram considerados ativos de acordo com o padrão proposto.

3. O ensaio de viabilidade celular, avaliando os macrófagos 48 h após o tratamento com a catequina mostrou-se uma citotoxicidade moderada. Porém, após o tratamento com o extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* foi observado uma diminuição da viabilidade celular à 200 µg/mL, onde foi observado apenas 40% de células viáveis, sendo considerado citotóxico nessa concentração.

4. Foi realizado dois modelos para avaliação da atividade do extrato bruto e da catequina no combate a infecção. O primeiro foi feito um tratamento pós-infecção. Após o período de infecção (48 h), o tratamento foi realizado por 72 h e mostrou que o extrato bruto apresentou uma ótima atividade, diminuindo a infecção em 73,7%, enquanto a catequina diminuiu em 43,3%, e o controle positivo Anfotericina B em 59%.

5. Para o modelo de avaliação da atividade das amostras pré-infecção, o tratamento foi realizado 48 h antes e mostrou que o extrato diminuiu em

60% a parasitemia, a catequina em 27,5% e o controle positivo Anfotericina B em 38%. Esses resultados permitiram sugerir que o extrato intensificou os mecanismos microbicidas dos macrófagos, levando à morte da *Leishmania*.

6. Na análise morfológica observamos que o tratamento das formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* com o extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum*, ou da catequina, estes mostraram um efeito sobre a membrana celular do parasito. Foram observadas alterações no tamanho, na forma e na estrutura do protozoário, quando comparadas com o controle.

Os compostos isolados e identificados não haviam sido relatados na literatura previamente em *Enterolobium ellipticum* e as atividades tanto do extrato quanto da catequina em formas amastigotas foram descritas pela primeira vez. Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que a catequina é um dos princípios ativos do extrato acetato de etila da casca do caule de *E. ellipticum* em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e que estudos futuros são necessários para avaliação dos efeitos *in vivo*.

## 7. PERSPECTIVAS

- Continuar o estudo fitoquímico da espécie *Enterolobium ellipticum*.
- Estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, são necessários para melhor compreensão do mecanismo de ação da catequina e do extrato bruto em *Leishmania amazonensis*.
- Realização de estudos adicionais com outras espécies de *Leishmania*, como também com outros gêneros de protozoários patogênicos.
- Avaliação da citotoxicidade dos outros compostos isolados.
- Finalizar a elucidação do SG.3 um provável terpeno.

## 8. REFERÊNCIAS

Albernaz, L. C.; de Paula, J. E.; Romero, G. A. S.; Silva, M. R. R.; Grellier, P.; Mambu, L.; Espindola, L. S.; Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, p. 116-121, 2010.

Alvar, J.; Ivaín D. V; Bern, C.;Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jean J.; den Boer, M.; Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence the WHO Leishmaniasis Control Team PLoS ONE v. 7, 2012.

Alves, A.C.S.; Moraes, D.C; de Freitas, G.B.L.; Almeida, D.J. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. *Rev. bras. plantas med.* vol.16 no.3. 2014.

Araujo F.R. F.; Andre W. P. P.; Cisneiros P. F. Leishmaniose tegumentar americana canina na zona rural do município de São Miguel, Rio Grande do Norte\* Leishmaniasis Tegumentary American dog in rural area of the county of São Miguel, Rio Grande do Norte *R. bras. Ci. Vet.*, v. 21, n. 3, p. 188-191. 2014.

Baratto, L. C.; Porsani, M. V.; Pimentel, I. C.; Pereira-Neto, A. B.; Paschke, R. ; Oliveira, B. H. Preparation of betulinic acid derivatives by chemical and biotransformation methods and determination of cytotoxicity against selected cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 68, p. 121-131, 2013.

Bennett, J. E. Antimicrobianos (continuentes antifúngicos. In: Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 10. Ed. New York: Mc Graw Hill, Cap. 49, p. 971-984. 2005.

Berker D. Clinical practice. Fungal nail disease. *N Engl J Med*; 14:2108-16. 2009.

Bezerra, J. L.; Costa, G. C.;Lopes, T. C.; Carvalho, I. C. D.S.; Patrício, F. J.; Sanara. M. Sousa, S. N.; Amaral, F. M. M.; Rebelo, J. M. M.; Guerra, R. N. M.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida

in vitro de plantas medicinais, Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 631-637, Dez. 2006

Birkholtz, L.M.; Williams, M.; Niemand, J.; Louw, A.I.; Persson, L.; Heby, O. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochem. J.* 438, 229–244. 2011.

Bonacorsi, C.; Raddi, M. S.; Carlos, I. Z.; Saninnomiya, M., Vilegas I, W.. Anti-Helicobacter pylori activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)*, v. 9, p. 1-7, 2009.

Bonel-Raposo, J.; Riet-Correa F.; Normanton G. T.; Schuch, I. D.; Grecco, F. B.; Fernandes C. G. Intoxicação aguda e abortos em cobaias pelas favas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae). *Pesq. Vet. Bras.* 28(12):593-596, dezembro 2008

Caldas, A.J.M.; Lisbôa L.L.C.; Silva, P.F.; Coutinho, N.P.S.; Silva, T.C. Perfil das crianças com leishmaniose visceral que evoluíram para óbito, falha terapêutica e recidiva em hospital de São Luís, Maranhão. *Rev Pesq Saúde*, 14(2): 91-95, maio-agost, 2013

Cavalheiro, A. J.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. D. S.; Castro-Gamboa, I.; Araújo, A. J. D.; Fuscilli, P. R.; Nakamura, M. S. Standardized plant extract, method for preparing an extract from plants of the *Sclerolobium* Genus, cosmetic composition, pharmaceutical composition and use of said extract. Patente-UNESP São Paulo. 2011

Chakravarty, J.; Sundar, S. Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2010.

Chalfie, M.; TU, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* v. 263, p. 802-5, 1994.

Choi, U.K.; Lee, O.H.; Yim, J.H.; Cho, C.W.; Rhee, Y.K.; Lim S.; Kim Y.C. Hypolipidemic and anti-oxidant effects of dandelion (*Taraxacum officinale*) root

and leaf on cholesterol fed rabbits. *International Journal of Molecular Sciences*; 11(1):67-68. 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008

Coelho-Finamore, J.M.; Freitas, V. C.; Assis R. R.; Melo, M.N.; Novozhilova, N.F. Secundino, P.F. Pimenta, S.J. Turco, R.P. Corrigendum to “*Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts” *Int J Parasitol*; 41:333–42. 2011.

Contijo, B.; Carvalho, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

Corrêa, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, , v. III, p. 41; v. 6, p. 254. 1926-1978

Costa, J. M. L.; Elkoury, A. N. M.; Bezerril, A. C. R.; Saldanha, A. C. . Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 79, p. 16-24, 2009.

Cragg, G.M., Newman, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

Croft, S. L., Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infec.* 17, 1478-1483. 2011

Cruz E. M.; Silva, E. R. da; Maquiaveli, C. do C.; Alves E. S. S.; Lucon Jr, J. F.; Reis M. B. G. Dos; Toledo, C. E. M.; Cruz F. G., Vannier-Santos, M. A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement *Phytochemistry* 89 71–77. 2013.

Cysne-Finkelstein, L.; Temporal, R.M.; Alves, F.A.; Leon, L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.*, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998

Dantas, Mariana Brito. Efeito do ácido betulinico no tratamento de dyslipidemia e diabetes em camundongos. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará, Pós graduação em Ciências Farmaceuticas, Fortaleza, 2011.

Doyle P. S.; Engel, J.C.; Pimenta, P. F. P.; Da Silva, P. P.; Dweyer, D. M. *Leishmania donovani* long term culture of axenic amastigotes at 37 °C. *Exp Parasitol*; 73:326-34. 1991.

Doyle, J.J.; Luckow, M.S. The rest of the iceberg legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*. v. 131, p. 900-910, 2003.

Feng X.; Hongmei W; Xiangpei W; Ye Y; Yuanmin W; Haibing Q and Yanyan Z. RP-HPLC Characterization of Lupenone and  $\beta$ -Sitosterol in *Rhizoma Musae* and Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Lupenone in Diabetic Sprague-Dawley Rats. *Molecules*, 19(9), 14114-14127. 2014

Ferreira W. A.; Islam, A.; Andrade, A. P. S.; Fernandes, F. R.; Frézard, F. and Demicheli, C. Mixed Antimony(V) Complexes with Different Sugars to Modulate the Oral Bioavailability of Pentavalent Antimonial Drugs. *Molecules*, 19(5), 5478-5489. 2014

Ferreira, F. M.; Castro, R. A. O.; Batista, M. A.; Rossi, F. M. O.; Silveira-Lemos, D.; Frezard, F.; Moura, S. A. L.; Rezende, S. A. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research* (1987. Print), v. 113, p. 533-543, 2014.

Ganem, R. S. (Org.). *Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas*. Brasília, DF: Edições Câmara. 437 p. il. (Série memória e análise de leis, n. 2). Biblioteca(s): Embrapa Agroenergia. 2011

Girarde F. A.; Tonial F.; Chini, S. O.; Sobottka, A. M.; Scheffer-Basso, S. M. and Bertol, C. D.. Phytochemical profile and antimicrobial properties of *Lotus* spp. (Fabaceae) An. Acad. Bras. Ciênc. vol.86 no.3 Rio de Janeiro Sept. 2014 Epub July 11, 2014

Grannoum, M. A.; Long, L.; Cirino, A.J.; Miller, A. R.; Najafi, R.; Wang, L.; Sharma, K.; Anderson, M.; Memarzadeh, B. Efficacy of NVC-422 in the treatment of dermatophytosis caused by *Tricophyton mentagrophytes* using a guinea pig model. International Journal of Dermatology. 52: 567-571. 2013

Guerra, J. A.O.; Ribeiro, J.A.S.; Coelho, L.I.A.R. C.; Barbosa, M.G.V.; Paes, G.P. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 22: 2319-27. 2006

Huanzhang X.; Yao C.; Xian Z.; Xuemei Z. Effects of taraxasterol on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Journal of Ethnopharmacology v.155, Issue 1, Pages 753–757. 2014

Informativo Epidemiológico sobre o perfil epidemiológico das Leishmanioses no Distrito Federal. Ano 6, nº 3 – Julho de 2014

Jamshieed S. Das S.; Sharma M.P.; Srivastava P.S. Difference in in-vitro response and esculin content in two populations of *Taraxacum officinale* Weber. Physiology and Molecular Biology of Plants; DOI 10.1007/s12298-010-0038-2. 2010

Kim, M.; Jung, H. R.; Min, T. Purification, structure determination and biological activities of 20(29)-Lupen-3-ona from *Daedalopsis tricolor* (Buli, ex Fr.) Bond. Et Sing. Bulletin of the Korean Chemical Society. 22, 1, 59-62, 2001.

Lainson R. Shaw J.J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. Brit Med Bull; 28: 44-8. 1972

Lall, N.; Kishore, N.J. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? Ethnopharmacology, v.153, n.1, p.61-84, 2014.

Liu J; Xiong H; Cheng Y; Xu L; Zhang X. Effects of Taraxasterol on ovalbumin induced allergy in mice. *Journal of Ethnopharmacology*; 148(3):787-793. 2013

Maciel Santos, M E S.; Nogueira E F de C.; Lopes P. H. de S.; Torres B. C. A. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe v.13, n.2, p. 15-20. 2013*

Madureira, A.M.; Ascenso, J.R.; Valdeira, L, Duarte, A.; Frade, J.P.; Freitas, G.; Ferreira, M.J.U. Evaluation of the Antiviral and Antimicrobial Activities of Triterpenes Isolated from *Euphorbia segetalis*. *Journal Natural Products*, 17: 375-380. 2003

Magagnin, C.M.; Stopiglia, C.D.O.; Vieira, F.J.; Heidrich, D.; Machado, M.; Vetoratto, G.; Lamb, F.M.; Scroferneker, M.L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. *An Bras Dermatol*;86(4):694-701. 2011.

Martinez, P. A.; Christine A. P. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. *Immunology* 59:153-165. 2014

Mendonça, R. C.; Felfii, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva Júnior, M. C.; Rezende, A. V.; Filgueiras, T. S.b & Nogueira, P. E. Flora Vascular do Cerrado. Pp. 289-556. In: S. M. Sano & S. P. de Almeida, eds. *Cerrado Ambiente e Flora*. Brasília, EMBRAPA-CPAC. 1998.

Mesquita, A.L. Revisão taxonômica do Gênero *Enterolobium* Mart. (Mimosidadeae) para a região neotropical. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 1990.

Ministerio da saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- 2.ed. atual.. - Brasília, 2014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde,

Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

Müller G. G.; Kara-José N.; Castro R. S. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração Rev. bras.oftalmol. vol.72 no.2 Rio de Janeiro. 2013

Nakamura C. V.; Santos A. O.; Vendrametto M.C.; Luize O.S, Dias Filho B.P.; Cortez D. A. G.; Ueda-Nakamura T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck. Rev Bras Farmacogn 16: 61-66. 2006.

Negrão, G. N.; Ferreira, M. E. M. C. Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana e sua expansão no território Brasileiro. Revista Percurso - NEMO Maringá, v. 6, n. 1 , p. 147- 168, 2014

Neiva T.J.C.; Marcos J. M.; Monica H.; Hermes E. M.; Vituri, C. L.; Jovino S. F.; Elbio A. D.. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications Efeito das catequinas (catequina e epicatequina) na agregação plaquetária. Rev. bras. hematol. Hemoter; 25(4):207-212. 2003.

Nery-Guimaraes F. Leishmaniose experimental IV: Reprodução em hamster (*Cricetus auratus*) de uma leishmaniose cutânea nódulo-tumoral oriunda da Amazonia (*Histiocitoma leishmaniotico*). O Hospital; 40: 11-24. 1951

Nylén, S. & Eidsmo, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunology, v. 34. 12, p. 551-561, 2012.

Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol 11, 272–279. 2003

Oliveira L. F. G.; Gilbert B.; Villas Bôas G. K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando plantas e produtos naturais. Revista Fitos, Rio de Janeiro, v. 8(1): 1-72, Jan-Mar 2013

Oliveira, A. K. M.; Resende, U. M.; Schleder, E. J. D. Espécies vegetais e suas síndromes de dispersão em um remanescente de cerrado (sentido

restrito) do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul *Ambiência Guarapuava (PR)* v.10 n.2 p. 565 – 580. 2014

Perea, S.; Ramos, M.J.; Garau, M.; Gonzalez, A.; Noriega, A.R.; del Palacio A. Prevalence and risk factors of tinea pedis in the general population in Spain. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3226–30. Perfect JR, Schell WA The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis*; 22 (Suppl. 2):S112–S118. 2010

Récamier, K. S.; Hernández-Gómez, A.; González-Damián, J.; Ortega-Blake, I., Effect of membrane structure on the action of polyenes: nystatin action in cholesterol and ergosterol containing membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 237(1): 31-40, 2010.

Reis, S. R.; Gomes, L. H. M.; Ferreira, N. M.; Nery, L. R.; Pinheiro, F. G.; Figueira, L. P.; Soares, F. V.; Franco, A. M. R. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas *Acta amazônica* v. 43(1): 121 – 124. 2013.

Rezende-Soares, F. A. ; Carvalho-Campos, C. ; Marques, M. J. ; Porcino, G. N. ; Giarola, N. L. L. ; Costa, B. L. S. ; Taunay-Rodrigues.A ; Faria-Pinto, P. ; Souza, M. A. ; Diniz, V. A. ; Corte-Real, S. ; Juliano, M. A. ; Juliano, L. ; Vasconcelos, E. G. . Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. *Parasitology (London. Print)*, v. 137, p. 773-783, 2010.

Roberts, W.L.; Berman, J.D., Rainey, P.M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 39, p. 1234-1239. 1995.

Sacks, D.L.; Perkins, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *S.cience.*;223 (4643):1417-9. 1984

Sandhu, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia*

(Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4681-4692, 2010.

Santana D. B., 2013 Atividade leishmanicida e antifúngica de extratos de plantas do Cerrado e isolamento do pterocarpano vatacarpina em *Vatairea macrocarpa*. Universidade de Brasília. 2013

Scabora, M. H.; Maltone, K. L.; Cassiolato, A. M. R. Crescimento, fosfatase acida e micorrização de espécies arboas em solo de Cerrado degradado. *Brangantina*, Campinas, v.89, n.2, p.445-451, 2010.

Schmitz, W.; Saito, A.Y.; Estevão, D.; Saridakis, H.O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semin Cienc Biol Saude* 26: 119-130. 2005.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde. 120 p.: il. 2014.

Seebacher, C.; Bouchara, Jean-Philippe.; Mignos B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166: 335-352. 2008

Sereno, D.; Hozmuller, P.; Mangot, I.; Curry, G.; Quaiissi, A.; Lemesre, J.P. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 45, p.2064-2069, 2001.

Shimomura, O.; Johnson, F. H.; and Saiga, Y. "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*," *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223–239. 1961.

Silva Junior, M. C. 100 árvores do Cerrado: Guia de campo. 1 ed. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado. 278p. 2005

Silva, Cristiane Bezerra da. *Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (polygalaceae) e *Microlobius foetidus* (subsp. paraguensis (benth.) M. Sousa et G. Andrade) (fabaceae-mimosoideae): contribuição ao

estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida) / Cristiane Bezerra da Silva. –Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Curitiba, 2014.

Silva, L.G.; Santos, S. Nota: modelos digitais de terreno como ferramenta de suporte para mapeamento de unidades de conservação do Cerrado. Revista GEOMAE - Geografia, Meio Ambiente e Ensino. Vol. 03, Nº 01, 1º SEM/2012

Silva, Sandra Márcia Mazzuti da. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado. Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília. 2013

Silveira, F. T; Lainson, R.; Corbett, C. E.P. Clinical and immunopathological Spectrum of American Cutaneous leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazoniam Brazil – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz;99 (3): 239-51. 2004.

Stankov, M. V. et al. Mitochondrial DNA Depletion and Respiratory Chain Activity in Primary Human Subcutaneous Adipocytes Treated with Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, n. 1, p. 280-287, U.S.A., Jan, 2010

Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T.J.; Tosun, F.; Ruedi, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. Antimicrob Agents Ch 50: 1352-1364. 2006

Teixeira, M.C.A.; Santos, R.J.; Sampaio, R.B.; Pontes-de-Carvalho, L.; Dos-Santos, W.L.C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different Leishmania species. Parasitol. Res., v. 88, p. 963-968, 2002.

Thomas, P. C. D.; Balasegaram, M.; Beijnen J. H. and Vries P. J. de. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment

of leishmaniasis. J. Antimicrob. Chemother. (2012)67 (11): 2576-2597.doi: 10.1093/jac/dks275First published online: July 24, 2012

Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, P.; Nakamura, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. International Journal of Infectious Diseases, v.15 e525–e532, 2011.

UpToDate® - acessado em 18 de novembro de 2014  
<http://www.uptodate.com/pt/home>

Van Den Dool, H.; Kratz, P.D., J. Chromatography,11, 463-471. 1963.

Velez, A. P.; Greene, J. N.; Facp, M.D.; Albert, L. V.; Elko-Simms, L. M. Impact and Etiology of Periungual Toe Infections in Neutropenic Patients. Infectious Diseases in Clinical Practice - Volume 20 - Issue 6 - p e31–e34 2012

WWF Brasil - acessado 2 de novembro de 2014 <http://www.wwf.org.br>

Zuco, V; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris.; Marchesi, E. Passerini, C. G., Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. Cancer Lett., v. 175, p. 17-25, 2002